

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平11-500408

(43) 公表日 平成11年(1999) 1月12日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	F I	
A 6 1 K 38/43	A E D	A 6 1 K 37/465	A E D
38/45	A B N	C 1 2 N 9/99	
38/46		A 6 1 K 37/64	A C B
38/55	A C B	37/52	A B N
C 1 2 N 9/99		37/54	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 64 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平8-514147	(71) 出願人	ザイモジェネティクス, インコーポレイテ ィド
(86) (22) 出願日	平成7年(1995)10月24日		アメリカ合衆国, ワシントン 98102, シ アトル, イーストレイク アベニュー イー スト 1201
(85) 翻訳文提出日	平成9年(1997)4月23日	(71) 出願人	ノボ ノルディスク アクティーゼルスカ プ
(86) 国際出願番号	P C T / U S 9 5 / 1 3 9 2 5		デンマーク国, デーヨーー2880 バグスバ エルト, ノボ アレ (番地なし)
(87) 国際公開番号	W O 9 6 / 1 2 8 0 0	(74) 代理人	弁理士 石田 敬 (外3名)
(87) 国際公開日	平成8年(1996)5月2日		
(31) 優先権主張番号	0 8 / 3 2 7, 6 9 0		
(32) 優先日	1994年10月24日		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		
(31) 優先権主張番号	0 8 / 4 7 5, 8 4 5		
(32) 優先日	1995年6月7日		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 改良型▲V I I ▼因子

(57) 【要約】

凝血カスケードを有効に妨害する化合物を製造するためにVII因子の触媒活性部位を改良する。この改良はVII a 因子を、血漿X又はIX因子を実質的に活性化できないものにする。この改良型VII因子の薬理組成物は様々な凝固関連障害を処置するのに利用される。

## 【特許請求の範囲】

1. 患者の組織因子活性を阻害するための方法であって、この患者に、触媒中枢において少なくとも一つの改良を有するVII因子を含んで成る治療的に有効な投与量の組成物を投与することを含んで成り、ここでこの改良は血漿X又はIX因子を活性化するこの改良型VII因子の能力を実質的に阻害するものである、方法。

2. 前記改良が、VII因子とセリンプロテアーゼインヒビターとの反応を含んで成る、請求項1記載の方法。

3. 前記プロテアーゼインヒビターが有機燐化合物、スルファニルフルオリド、ペプチドハロメチルケトン又はアザペプチドである、請求項2記載の方法。

4. 前記プロテアーゼインヒビターがダンシル-Phe-Pro-Argクロロメチルケトン、ダンシル-Glu-Gly-Argクロロメチルケトン、ダンシル-Phe-Phe-Argクロロメチルケトン及びPhe-Phe-Argクロロメチルケトンから選ばれるペプチドハロメチルケトンである、請求項3記載の方法。

5. 患者の血小板沈着を阻害するための方法であって、この患者に、触媒中枢において少なくとも一つの改良を有するVII因子を含んで成る治療的に有効な投与量の組成物を投与することを含んで成り、ここでこの改良は血漿X又はIX因子を活性化するこの改良型VII因子の能力を実質的に阻害するものである、方法。

6. 前記改良が、VII因子とセリンプロテアーゼインヒビターとの反応を含んで成る、請求項5記載の方法。

7. 前記プロテアーゼインヒビターが有機燐化合物、スルファニルフルオリド、ペプチドハロメチルケトン又はアザペプチドである、請求項5記載の方法。

8. 前記プロテアーゼインヒビターがダンシル-Phe-Pro-Argクロロメチルケトン、ダンシル-Glu-Gly-Argクロロメチルケトン、ダンシル-Phe-Phe-Argクロロメチルケトン及びPhe-Phe-Argクロロメチルケトンから選ばれるペプチドハロメチルケトンである、請求項7記載の方法。

9. 前記VII因子の改良が、Ser, Asp及びHisの触媒性トリアドにおける少なくとも1個のアミノ酸の置換、挿入又は欠失を含んで成る、請求項5記載の方法。

。

10. 患者の血管再狭窄を阻害するための方法であって、この患者に、触媒中枢において少なくとも一つの改良を有する薬理学的に許容されるVII因子を含んで成る治療的に有効な投与量の組成物を投与することを含んで成り、ここでこの改良は血漿X又はIX因子を活性化するこの改良型VII因子の能力を実質的に阻害するものである、方法。

11. 前記改良が、VII因子とセリンプロテアーゼインヒビターとの反応により施されるものである、請求項10記載の方法。

12. 前記プロテアーゼインヒビターが有機燐化合物、スルファニルフルオリド、ペプチドハロメチルケトン又はアザペプチドである、請求項11記載の方法。

13. 前記プロテアーゼインヒビターがダンシル-Phe-Pro-Argクロロメチルケトン、ダンシル-Glu-Gly-Argクロロメチルケトン、ダンシル-Phe-Phe-Argクロロメチルケトン及びPhe-Phe-Argクロロメチルケトンから選ばれるペプチドハロメチルケトンである、請求項12記載の方法。

14. 前記VII因子の改良が、Ser, Asp及びHisの触媒性トリアドにおける少なくとも1個のアミノ酸の置換、挿入又は欠失を含んで成る、請求項10記載の方法。

15. 前記血管再狭窄が動脈に対する機械的損傷の二次的なものである、請求項10記載の方法。

16. 前記機械的損傷がバルーン血管形成術、動脈血管内膜切除術、整復アテローム切除術、ステント設置、レーザー治療又はロトブレーションにより生じたものである、請求項15記載の方法。

17. 前記組成物を、前記動脈に機械的損傷を与える24時間前以内に個体に投与する、請求項15記載の方法。

18. 前記組成物を、前記動脈に機械的損傷を与えた後に個体に更に投与する、請求項15記載の方法。

19. 前記血管再狭窄が血管移植片、ステント、バイパス移植片又は器官移植片の中で生じたものである、請求項10記載の方法。

20. 前記組成物を、前記移植片、ステント、バイパス移植片又は器官移植片の設置の24時間前以内に個体に投与する、請求項19記載の方法。

21. 前記組成物を、前記移植片、ステント、バイパス移植片又は器官移植片の設置の後に個体に投与する、請求項19記載の方法。

22. 前記個体に組織プラスミノゲンアクチベーター又はストレプトキナーゼを更に投与することを含んで成る、請求項10記載の方法。

23. 個体における冠状動脈の急性閉塞を処置するための方法であって、触媒中枢において少なくとも一つの改良を有する薬理学的に許容されるVII因子を含んで成る組成物をこの個体に組織プラスミノゲンアクチベーター又はストレプトキナーゼと一緒に投与することを含んで成り、ここでこの改良は血漿X又はIX因子を活性化するこの改良型VII因子の能力を阻害するものである、方法。

**【発明の詳細な説明】**

## 改良型VII因子

## 関連出願

本発明は、それぞれ引用することで本明細書に組入れる、1994年5月23日提出のPCT/US94/05779号の一部継続出願である1994年10月24日提出出願第08/327,690号、並びにPCT/US92/01636号及び放棄され、そして現在出願08/164,666号となった1991年2月28日提出の出願07/662,920号の一部継続出願である。

## 発明の分野

本発明は抗凝固剤として有用なタンパク質に関する。より詳しくは、本発明は血液凝固及び組織因子を阻害するVII因子の改良型に関する。

## 発明の背景

血液凝固は、フィブリン凝塊を最終的にもたらし様々な血液成分又は因子の複雑な相互作用より成る過程である。一般に、凝固「カスケード」と呼ばれているものに関与する血液成分はプロ酵素又はチモゲン即ち、それ自体が凝固因子であるアクチベーターの作用によりタンパク質分解酵素へと変換される酵素的に不活性なタンパク質である。かかる変換を経た凝固因子は一般的に「活性因子」と呼ばれており、そして小文字「a」の接尾辞の付加により命名されている（例えばVIIa因子）。

活性化X因子（「Xa」）はプロトロンビンをトロンビンに変換せしめるのに必要であり、このトロンビンは次にフィブリン凝塊を

形成する最終段階としてフィブリノーゲンをフィブリンに変換せしめる。X因子の活性化を促進する2つの系又は経路がある。「内因性経路」とは、血漿の中にのみ存在している因子の利用を通じてトロンビン形成をもたらし反応を意味する。一連のプロテアーゼ媒介型活性化は最終的にIXa因子をもたらし、それはVIIIa因子と協力して、X因子をXa因子へと解裂せしめる。同じタンパク質分解がVIIa因子及びその補因子である組織因子により、血液凝固の「外因性経路」において及ぼされる。組織因子は膜結合型タンパク質であり、そして通常は血漿の中で循環していない。しかしながら、血管の崩壊により、それはVIIa因子と複

合してX因子の活性化又はIX因子の活性化をCa<sup>++</sup>及びリン脂質の存在下で触媒する(Nemerson and Gentry, Biochem. 25: 4020-4033(1986))。これら2つの凝固経路の止血における相対的な重要性は明らかにされていないが、近年VII因子及び組織因子は血液凝固の調節において中枢的な役割を果たしていることが見い出せた。

VII因子は一本鎖チモゲンとして血液の中で循環する微量血漿糖タンパク質である。チモゲンは触媒的には不活性である(Williamsら, J. Biol. Chem. 264: 7536-7543(1989); Rao ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85 : 6687-6691(1988))。一本鎖VII因子はX a 因子、VII a 因子、IX a 因子又はトロンビンによりインビトロにおいて二本鎖のVII a 因子へと変換されうる。X a 因子はVII因子の主要生理学的アクチベーターであると信じられている。止血に関与するその他のいくつかの血漿タンパク質と同様に、VII因子はその活性に関してビタミンKに依存している。その活性はタンパク質のアミノ末端において集合している複数のグルタミン酸のγ-カルボキシル化にとって必要である。このようなγ-カルボキシル化グルタミン酸はVII因子とリン脂質との金属関与相互作用にとって必要である。

チモゲンVII因子の活性化二本鎖分子に至る変換はこの分子の中央にほぼ位置している内部ペプチド結合の解裂により起こる。ヒトVII因子において、その活性化解裂部位はArg<sub>152</sub>-Ile<sub>153</sub>である(Hagen ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 2412-2416 (1986); Thimら, Biochem. 27: 7785-7793 (1988); 共に引用することで本明細書に組入れる)。ウシのVII因子は類似のArg<sub>152</sub>-Ile<sub>153</sub>結合においての解裂により活性化される(Takeyaら, J. Biol. Chem. 263: 14868-14877, 1988)。組織因子、リン脂質及びカルシウムイオンの存在下において、この二本鎖VII a 因子は直ちにX因子又はIX因子を限定されたタンパク質分解により活性化する。

患者における凝血カスケードを選択的に阻止することが往々にして必要とされる。抗凝固剤、例えばヘパリン、クマリン、クマリン誘導体、インダンジオン誘導体又はその他の剤が、例えば腎臓透析の最中に、又は深遠静脈血栓、散在性血

管内凝固(DIC)、及びその他の数多くの医学的障害のホストの処置のために利用されうる。例えば、ヘパリン処置又はクエン酸イオンによる体外処置(米国特許第4,500,309号)が、処置の際の凝固を防ぐために透析において利用されうる。ヘパリンは手術を受けている患者における深遠静脈血栓を防ぐのにも利用されている。

しかしながら、ヘパリン及び抗凝固剤による処置は望ましくない副作用を有する。有用な抗凝固剤は一般に凝塊部位において特異的に作用するよりも、全身にわたって作用する。ヘパリンは例えば大量出血をもたらしうる。更に、約80分の半減期により、ヘパリンは血液から迅速に消失し、頻繁な投与を必要とする。ヘパリンは抗トロンビンIII(ATIII)にとっての補因子として働くため、そしてATIIIはDIC処置においては迅速に枯渇するため、適正なヘパリン投与量を維持することは往々にして難しく、ATIII及びヘパリンレベルの連

続モニターを必要とする。また、ATIIIの枯渇が極端である場合、ヘパリンは有効でない。更に、ヘパリンの長期利用は血小板の凝集を高めそして血小板計測数を減らすこともあり、そして骨粗しょう症の発症に関与する。インダンジオン誘導体も毒性副作用を有する。

上記に簡単に説明した抗凝固剤の他に、いくつかの天然タンパク質が抗凝固活性を有することが見い出されている。例えば、Reutelingsperger(米国特許第4,736,018号)はウシの大動脈及びヒトの臍静動脈から抗凝固性タンパク質を単離した。Makiら(米国特許第4,732,891号)はヒト胎盤由来の抗凝固性タンパク質を開示している。更に、ATIIIは治療用抗凝固剤として提案されている(Schipperら, *Lancet* 1(8069); 854-856(1978); Jordan, 米国特許第4,386,025号; Bockら, 米国特許第4,517,294号)。

脈管壁における平滑筋細胞(SMCs)の増殖は、血管の再構成後の又はその他の血管傷害に反応して、アテローム症における血管損傷の形成において重要な現象である。例えば、アテローム症の処置はしばしば、血管形成術、動脈血管内膜切除術もしくは整復アテローム切除術による閉塞血管の清掃又は、バイパス移植が含まれ、それらの外科処置においては、アテローム症プラークをカテーテルによ

り圧搾もしくは除去する（血管形成術）、切開を介して動脈壁から取り除く（動脈血管内膜切除術）、又は天然もしくは合成移植体でバイパスを施している。これらの手順は血管の内皮を除去してしまい、下にある内膜を乱し、そして内側のSMCsを死に致らしめる。この傷害には内側SMC 増殖及び内膜へと進行し続け、これは傷害を受けて最初の数週間から6ヶ月に至るまでに特徴的に生じ、そして上をかぶさる内皮層が再樹立されたときに止まる。ヒトにおいては、このような損傷は約20%の細胞と80%の細胞外マトリックスとより構成される。

血管形成術、動脈血管内膜切除術又はバイパス移植により処置した患者の約30%以上において、内膜における血栓及び／又はSMC 増殖は脈管の再閉塞を起こし、従って再構成外科は失敗に至る。術後の脈管の閉塞は再狭窄（restenosis）として知られている。

比較的低投与量において投与でき、そして伝統的な抗凝固性組成物に係る望まれない副作用をもたらない抗凝固活性を有する改良組成物が未だ当業界において要望されている。本発明は損傷部位において特異的に作用する抗凝固剤を提供することによりこの要望を満足せしめ、そして更には関連の利点を提供する。

#### 発明の概要

抗凝固活性を有する改良型VII因子を含んで成る新規組成物を提供する。この改良型VII因子組成物は組織因子も阻害する。このVII因子配列は少なくとも1個のアミノ酸改質を有し、ここでその改質は血漿X又はIX因子の活性化を触媒する活性化VII因子の能力を実質的に低め、それ故凝塊活性を阻害できるように選ばれる。この新規のVII因子は少なくとも1個のアミノ酸置換により改質された活性部位を有し、そしてその改良型は組織因子と結合することができる。この改良型VII因子組成物は一般に実質的に純粋な形態である。

本発明の組成物は薬理組成物へと配合せしめたときに患者の処置のための方法において極めて有用であり、ここでそれらは凝固関連症状を処置するために様々な疾患状態に苦しむ個体に付与せしめることができる。組織因子に結合できるが、凝塊カスケードにおけるその他の因子の活性化を触媒する実質的に低減された能力を有するかかる改質型VII因子分子は、その他の抗凝固剤と比べたとき、長



めの血漿半減期を有し、それ故対応の長めの抗凝固活性期間を有しうる。課題の組成物にとっての医学的用途には、抗凝固剤で一般的に

処置されるもの、例えば深遠静脈血栓、肺塞栓症、発作、散在性血管内凝固(DIC)グラム陰性内毒素血症の関与する肺及び腎臓におけるフィブリン沈着、並びに心筋梗塞が挙げられる。この組成物はバルーン血管形成術、動脈血管内膜切除術、整復アテローム切除術、ステント設置、レーザー治療もしくはロトブレーションにより生ずる損傷の如き機械的血管損傷に引き続いて起こる、又は血管移植、ステント、バイパス移植もしくは器官移植に二次的に起こる血管再狭窄を阻害するのに利用できる。かくして、かかる組成物は血小板沈着並びに関連の障害を阻止するのに利用できる。それ故に、凝固、血管再狭窄又は血小板沈着を阻止する方法は、例えば改良型VII因子、例えばSer<sub>344</sub>, Asp<sub>242</sub>及びHis<sub>193</sub>の触媒性トリアドにおいて少なくとも1個のアミノ酸置換を有するものを、凝固、血管狭窄又は血小板沈着のそれぞれを阻害するのに有効な量において含んで成る組成物を患者に投与することを含んで成る。この方法はまた、個体の冠状動脈の急性閉塞の処置において有用であり、その処置はDEGR-VII因子を含む改質VII因子を組織プラスミノゲンアクチベーター又はストレプトキナーゼと一緒に投与することを含んで成り、そしてtPA誘導型血栓溶解を促進できる。

一般に、ヒトへの投与にとって、この薬理組成物は改良型ヒトVII因子タンパク質並びに薬理学的に許容される担体及びバッファーを含んで成るであろう。

ヒト及びウシVII因子の好適な態様において、その活性部位の残基Ser<sub>344</sub>は改質、即ちGly, Met, Thr 又はより好ましくはAla により置換されている。かかる置換は独立になされているか、又はHis<sub>193</sub>及びAsp<sub>242</sub>を含む触媒性トリアドにおけるその他の部位においての(1又は複数の)置換との組合せにおいてなされているよい。

別の観点において、本発明は、ビタミンK依存性血漿タンパク質

のプレプロペプチド及びgla ドメイン並びにgla ドメインレスVII因子タンパク質をそれぞれコードする2本の作動連結した配列コード領域を含んで成るポリ

ヌクレオチド分子に関連し、ここでその発現を経て、このポリヌクレオチドは血漿X又はIX因子を有意に活性化せず、且つ組織因子に結合することのできる改良型VII因子分子をコードする。このポリヌクレオチドにより発現される改良型VII因子分子は生物学的に活性な抗凝固剤であり、即ち、それは凝固カスケードを阻害でき、それ故フィブリン沈着物又は凝塊の形成を阻害できる。この改良型VII因子を発現させるため、このポリヌクレオチド分子を哺乳動物細胞系、例えばBHK, BHK 570又は 293細胞系にトランスフェクトさせる。

#### 図面の簡単な説明

図1はSer<sub>344</sub>→Ala 改良型VII因子DNA 配列のための発現ベクターの構築を示している。使用した記号は以下の通りである：O-1、アデノウィルス5由来のO-1地図単位配列；E、SV 40エンハンサー；MLP、アデノウィルス2主要後期プロモーター；SS、一式のスプライス部位；そしてPA、SV 40 由来のポリアデニル化シグナル（遅い順〔late orientation〕）。

図2は、食塩水処置したコントロールと比較した、動脈血管内膜切除術を施したヒヒの大動脈に対する血栓形成（血小板沈着）に及ぼすDEGR-VIIa 因子のボラス注射の効果を示す。動脈は60分間にわたり測定した。DEGR-VIIa 因子はこの急性血管損傷の霊長類モデルの血小板に富む血栓の発生を有意に阻止した。

図3はヒヒの平滑筋細胞を、F VIIa（白四角）とその濃度を上昇させながら又は一定量のF VIIa（5 nM）の存在下でDEGR-F VIIa（黒四角）とその濃度を上昇させながらインキュベートしたときに得

られた結果を示す。Fxの活性化のレベルは発色基質S-2222を用いてその後決定した。データは5 nMのF VIIa のみの存在下で生ずる活性のパーセンテージとしてのアミド分解活性として示す。

図4は、コントロール動物と比較した、頸動脈血管内膜切除術及び7～30日間にわたるDEGR-VIIa 因子による処置を経たヒヒの内膜面積を示す。

図5はバルーン損傷及びDEGR-VIIa 因子による処置を経たヒヒ大腿動脈の内膜面積、対、内膜+中膜面積の比を示し、ここでコントロールグループは5本の血管を含み、7日目の処置では11本の血管を調べ、そして30日目の処置では2本

の血管を調べた（n = 調べた血管の本数）。

#### 特定態様の詳細

抗凝固活性を有する新規の改良型VII因子を本発明により提供する。この改良型VII因子はチモゲンの形態（即ち、一本鎖分子）であるか、又はその活性部位において解裂されていてよい。従って、「改良型VII因子」とは、組織因子に結合し、そしてIXaに至るIX因子の及びXaにX因子の活性化を阻害する改良型VII因子及び改良型VIIa因子分子をいう。この改良型VII因子の組成物は様々な哺乳類、特にヒトに凝固カスケードを阻害するために投与するのに適する。改良型VII因子は他の抗凝固性化合物と一緒に、又はそれらの代わりに患者に投与してよい。

VII因子は凝固カスケード、特に外因性経路に関与するものにおいて重要な役割を果たす。不活性の一本鎖チモゲンタンパク質として循環血漿の中に存在しているVIIa因子が組織因子及びカルシウムイオンとの組合せで活性化されると、X因子をXa因子に活性化し、そしてIX因子をIXa因子に活性化し、フィブリン凝塊の最終的形成

が伴う。

本発明は、VIIa因子によりX及びIX因子の活性化を阻止又はそうでなければ阻害することによりこの凝固カスケードにおけるこの一連の現象を阻害する能力を提供する。本発明のVII因子タンパク質のVIIa因子の触媒活性を低め、同時にその分子が組織因子に対する結合能力を保持するように改質された触媒性部位を有する。この改良型VII因子分子は組織因子に対する結合に関して天然のVII因子及び／又はVIIa因子と競合する。その結果、X及びIX因子の活性化は阻害される。

本発明の一の観点において、VIIa因子の触媒活性は触媒中枢又はトリアドの化学的誘導化により阻害される。誘導化はVII因子を不可逆性インヒビター、例えば有機燐化合物、スルホニルフルオリド、ペプチドハロメチルケトン又はアザペプチドとの反応により、又は例えばアシル化により成し遂げられうる。好適なペプチドハロメチルケトンにはPPACK（D-Phe-Pro-Argクロロメチルケトン；米国

特許第 4,318,904号；引用することで本明細書に組入れる）、D-Phe-Phe-Arg 及び Phe-Phe-Arg クロロメチルケトン；並びに DEGRcK（ダンシル-Glu-Gly-Arg クロロメチルケトン）が含まれる。

別の観点において、VIIa 因子の触媒活性はアミノ酸を置換、挿入又は欠失することによっても阻害できる。好適な態様において、アミノ酸置換は、VIIa 因子触媒性部位に寄与するアミノ酸を含む領域として本明細書において定義する VI I 因子触媒性トリアドのアミノ酸配列において施す。触媒性トリアドにおける置換、挿入又は欠失は、この触媒性部位を構成するアミノ酸、又はその隣りに施す。ヒト及びウシの VII 因子タンパク質において、触媒性「トリアド」を構成するアミノ酸は Ser<sub>344</sub>、Asp<sub>242</sub> 及び His<sub>193</sub> である（添数字は配列における位置を表示している）。その他の哺乳類に由来する VII 因子に

おける触媒性部位は現状有用な技術、とりわけタンパク質単離及びアミノ酸配列分析を利用して決定されうる。触媒性部位は配列を他のセリンプロテアーゼ、特にキモトリプシンであってその活性部位が既に決定されているもの（Siglerら、J. Mol. Biol., 35 : 143-164(1968)；引用することで本明細書に組入れる）と整合させ、その整合から類似である活性部位残基を決定することによっても決定することができる。

アミノ酸の置換、挿入又は欠失は X 及び / 又は IX 因子の VIIa 因子による活性化を阻止又はそうでなければ阻害するように施す。しかしながら、VII 因子は凝固カスケードにおける組織因子に対する結合について真性の VII 因子及び / 又は VIIa 因子と競合する能力も保持するように改質されているべきである。かかる競合は例えば本明細書に記載の凝塊アッセイにより、又は例えばヒトの膀胱癌細胞系 J 28 の如くの細胞表層組織因子を有する細胞系（Sakai ら、J. Biol. Chem. 264 : 9980-9988(1989)；引用することで本明細書に組入れる）を用いる競合結合アッセイにより、簡単に決定できうる。

VII 因子における触媒性部位を構成するアミノ酸、例えばヒト及びウシの VII 因子における Ser<sub>344</sub>、Asp<sub>242</sub> 及び His<sub>193</sub> は置換又は欠失のいずれかを行ってよい。本発明においては、1 個のアミノ酸のみを変え、それ故分子の抗原性の増強する

傾向を最少限にする、又は組織因子に結合するその能力を阻害する傾向を最少限にすることが好ましいが、2個以上のアミノ酸の変化(置換、付加又は欠失)を施してもよく、そして置換、付加及び欠失の組合せを施してもよい。ヒト及びウシのVII因子にとっての好適な態様において、Ser<sub>344</sub>はAlaにより置換することが好ましいが、Gly, Met, Thr 又はその他のアミノ酸で置換してもよい。Asp を Glu に置き換え、そしてHis をLys 又はArg で置き換えることが好ましい。一般に、置換は三次タ

ンパク質構造の破綻を最少限にするように選ぶ。本明細書に引用することで組入れるDayhoffらのモデル(Atlas of Protein Structure 1978, Nat'l Biomed. Res. Found., Washington, D.C.)はその他のアミノ酸置換を選ぶうえでの指針として用いられうる。ヒト、ウシ又はその他の種の適当なVII因子配列の触媒性部位において上記の残基変化を導入し、そして得られるタンパク質を本明細書に記載の通りにして所望の触媒活性阻害レベルについて及びその結果としての抗凝固活性について試験することができうる。改良型VII因子にとって、この触媒活性は実質的に阻害され、対応の種の野生型VII因子の触媒活性の一般に約5%未満、より好ましくは約1%未満となるであろう。

本発明のタンパク質は組換えDNA技術の利用を介して製造することができうる。一般に、クローンした野生型VII因子DNA配列は所望のタンパク質をコードするように改良されている。この改良型配列を次に発現ベクターに挿入し、それを次に宿主細胞の中に形質転換又はトランスフェクトする。高等真核細胞、特に培養哺乳動物細胞が宿主細胞として好ましい。ヒトVII因子にとっての完全なヌクレオチド及びアミノ配列が公知である。引用することで本明細書に組入れる米国特許第4,784,950号を参照のこと。それにおいては、組換えヒトVII因子のクローニング及び発現が記載されている。ウシのVII因子配列は、引用することで本明細書に組入れるTnkeyaらのJ. Biol. Chem. 263 : 14868-14872(1988)に記載されている。

アミノ酸配列の改変は様々な技術によって成し遂げられうる。DNA配列の改良は部位特異的突然変異誘発によって施してよい。部位特異的突然変異誘発によっ

ての技術は当業界に公知であり、そして例えばZoller and Smith(DNA 3 : 479-488, 1984)に記載されている。即ち、VII因子のヌクレオチド及びアミノ酸配列を利用するこ

とにより、選り抜きの改変を導入することができる。

本発明に従って改良されたVII因子には、そのアミノ末端領域(gla ドメイン)がビタミンK依存性血漿タンパク質IX因子、X因子、プロトロンビン、プロテインC、プロテインS又はプロテインZのいずれかのgla ドメインで置換されているものが含まれる。ビタミンK依存性血漿タンパク質のgla ドメインは、ガンマーカルボキシグルタミン酸残基の存在を特徴とし、そして一般に長さが約30～約40個のアミノ酸であり、C末端は関連遺伝子におけるエクソン-イントロン境界の位置に対応している。異種gla ドメインを有するVII因子の製造のための方法は引用することで本明細書に組入れる米国特許第 4,784,950号に開示されている。

本発明において使用するためのDNA 配列は一般に、宿主細胞による適正な後翻訳プロセス(例えば、グルタミン酸残基のガンマーカルボキシル化)及び分泌を得るため、VII因子タンパク質のアミノ末端にあるプレプロペプチドをコードするであろう。このプレプロペプチドはVII因子又はその他のビタミンK依存性血漿タンパク質、例えばIX因子、X因子、プロトロンビン、プロテインCもしくはプロテインSのそれであってよい。当業者にとって明らかな通り、この改良型VII因子のアミノ酸配列において追加の改質を施してよく、この場合その改質は抗凝固剤として働くそのタンパク質の能力を有意に損わないものとする。例えば、触媒性トリアドにおいて改質されたVII因子はチモゲンVII因子からその活性化された二本鎖形態に至る変換を阻害するようにその活性化裂部位において改質されていてもよい(これは一般に、引用することで本明細書に組入れる米国特許第 5,288,629号に記載されている)。

本発明の実施において利用する発現ベクターはクローン化遺伝子又はcDNAの転写を指令できるプロモーターを含んで成るであろう。

培養哺乳動物細胞において利用するために好適なプロモーターにはウィルス性プロモーター及び細胞性プロモーターが含まれる。ウィルス性プロモーターにはSV 40 プロモーター (Subramani ら, Mol. Cell. Biol. 1 : 854-864, 1981) 及びCMV プロモーター (Boshart ら Cell 41 : 521 - 530, 1985) が含まれる。特に好適なウィルス性プロモーターはアデノウィルス由来の主要後期プロモーターである (Kanfman and Sharp, Mol. Cell. Biol. 2 : 1304-1319, 1982)。細胞性プロモーターにはマウスカッパー遺伝子プロモーター (Bergman ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 7041-7045, 1983) 及びマウス  $V_H$  プロモーター (Loh ら, Cell 33 : 85-73, 1983) が含まれる。特に好適な細胞性プロモーターはマウスのメタロチオネイン-I プロモーターである (Palmiter ら, Science 222 : 809 - 814, 1983)。発現ベクターは、プロモーターの下流、且つVII因子配列自体についての挿入部位の上流に位置する一式のRNA スプライス部位も含みうる。好適なRNA スプライス部位はアデノウィルス及び／又はイムノグロブリン遺伝子から獲得できうる。発現ベクターの中に更に含まれているのは挿入部位の下流に位置するポリアデニル化シグナルである。特に好適なポリアデニル化シグナルには、SV 40 由来の初期もしくは後期ポリアデニル化シグナル (Kanfman and Sharp, 前掲)、アデノウィルス5E1b 領域由来のポリアデニル化シグナル、ヒト成長ホルモン遺伝子ターミネーター (DeNoto ら, Nuc. Acids Res. 9 : 3719-3730, 1981) 又はヒトVII因子遺伝子もしくはウシVII因子遺伝子由来のポリアデニル化シグナルが含まれる。この発現ベクターは更に非コードウィルスリーダー配列、例えばこのプロモーターとこのRNA スプライス部位との間に位置するアデノウィルス2三分節系リーダー；及びエンハンサー配列、例えばSV 40 エンハンサーを含みうる。

クローン化DNA 配列を培養哺乳動物細胞に、例えばリン酸カルシウム媒介トランスフェクションにより (Wigler ら, Cell 14 : 725-732, 1978 ; Corsaro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7 : 603 - 616, 1981 ; Graham and Van der Eb, Virology 5201 : 456 - 467, 1973) 又はエレクトロポレーションにより (Neumann ら, EMBO J. 1 : 841 - 845, 1982) 導入する。外生DNA を発現する細胞

を同定及び選別するため、選択性表現型（選択マーカー）を授ける遺伝子を一般に課題の遺伝子又はcDNAと一緒に細胞に導入する。好適な選択マーカーにはネオマイシン、ヒグロマイシン及びメトトレキサートの如くの薬剤に対する耐性を授ける遺伝子が含まれる。この選択マーカーは増幅性選択マーカーであってよい。好適な増幅性選択マーカーはジヒドロフォレートリダクターゼ（DHFR）配列である。選択マーカーはThilly (Mammalian Cell Technology, Butterworth Publishers, Stoneham, MA ; 引用することで本明細書に組入れる) により論じられている。選択マーカーの選択は当業者においてよく知られている。

選択マーカーは課題の遺伝子と同時に独立のプラスミド上で細胞の中に導入するか、又はそれらは同一のプラスミド上で導入することができうる。同一のプラスミド上のとき、選択マーカー及び課題の遺伝子は異なるプロモーター又は同一のプロモーターのコントロール下にあつてよく、後者の配備は二重シストロン系情報をもたらす（例えば、Levinson and Simonsen, 米国特許第 4,713,339号）。「キャリアーDNA」として知られる追加のDNA を、細胞に導入する混合物に加えることが好都合であることもある。

細胞がDNA を取り込んだ後、それらを適当な増殖培地の中で一般に1～2日間増殖させて課題の遺伝子の発現を開始させる。本明細書で用いている「適当な増殖培地」は栄養物並びに細胞の増殖及び

改良型VII因子遺伝子の発現にとって必要とされるその他の成分を含む培地を意味する。培地は一般に炭素源、窒素源、必須アミノ酸、必須糖、ビタミン、塩、リン脂質、タンパク質及び増殖因子を含む。ガンマーカルボキシル化改良型VII因子の製造のためには、その培地はビタミンKを、好ましくは約  $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$  ～ 約  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度において含むであろう。次いで安定な状態で選択マーカーを発現する細胞の増殖のために薬剤選択を利用する。増殖性選択マーカーでトランスフェクトされた細胞にとっては、その薬剤濃度は、増加したコピー数のクローン化配列を選択するため、それ故発現レベルを高めるために増大させてよい。安定的にトランスフェクトされた細胞のクローンを次に改良型VII因子の発現についてスクリーンにかける。



本発明における使用にとって好適な細胞系には COS-1 (ATCC CRL 1650)、ペビーハムスター腎臓(BHK)及び293 (ATCC CRL 1573; Grahamら, J. Gen. Virol. 36 : 59-72, 1977) 細胞系が含まれる。好適なBHK 細胞系はtk<sup>-</sup> ts 13 BHK 細胞系である (Waechter and Baserga, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 : 1106-1110, 1982, 引用することで本明細書に組入れる)。以降、これをBHK 570 細胞と呼ぶ。BHK 570 細胞系はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション, 12 301 Parklawn Dr., Rockville, MD 20852 に、ATCC受託番号第CRL 10314 で寄託されている。tk<sup>-</sup> ts 13 BHK 細胞系もATCCから受託番号CRL 1632として入手できる。更に、数多くのその他の細胞系も本発明において利用でき、それには以下のものが含まれる。

ラットHep I (ラットの肝癌; ATCC CRL 1600)、ラットHep II (ラットの肝癌; ATCC CRL 1548)、TCMK (ATCC CCL 139)、ヒト肺 (ATCC HB 8065)、NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1)、CHO (ATCC CCL 61)

及びDUKX細胞 (Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 : 4216-4220, 1980)。

本発明において、改良型VII因子を作るために遺伝子導入動物技術を利用してよい。該タンパク質を雌の宿主哺乳動物の乳腺内で作るのが好ましい。乳腺内での発現及び乳への注目のタンパク質のその後の分泌はタンパク質をその他の起源から単離するうえで遭遇する数多くの困難性を解消する。乳は既に集められており、大量に入手でき、そして生化学的によく特性決定されている。更に、主要乳タンパク質は乳の中の高濃度で存在する (一般に約 1 ~ 15 g / l)。商業的観点から、宿主として大量の乳を産生する種を利用することが明らかに好ましい。マウス及びラットの如き小型の動物が利用できるが (そして原理的な段階の証明として好適であるが)、本発明においては、家畜哺乳動物、例えば限定することなくブタ、ヤギ、ヒツジ及びウシが好ましい。ヒツジが特に好ましく、その理由はこの種における遺伝子導入の今までの歴史、乳生産、費用、及びヒツジ乳を回収するための装置の既存の如き要因にある。ホストの種の選定に影響を及ぼす要因の比較についてはWIPO公開WO 88/00239 号を参照のこと。一般に、乳製品の

用途のために繁殖させたホスト動物の品種、例えばイースト・フリースランド・ヒツジを選定するか、又は遺伝子導入系の繁殖を介して乳製品ストックに後に導入することが一般に所望される。いずれにせよ、既知であり、良好な健康状態の動物を利用すべきである。

乳腺内での発現を得るため、乳タンパク質遺伝子由来の転写プロモーターを利用する。乳タンパク質遺伝子には、カゼイン（引用することで本明細書に組入れる米国特許第 5,309,489号）、ベーター・ラクトグロブリン、 $\alpha$ -ラクトアルブミン及び乳漿酸性タンパク質をコードする遺伝子が含まれる。ベーター・ラクトグロブリン（

BLG）プロモーターが好ましい。ヒツジのベーター・ラクトグロブリン遺伝子の場合、この遺伝子の5'隣接配列の少なくとも近位 406bp領域が一般に利用されるであろうが、約5 kbp に至るまでの5'隣接配列のより大きな部分、例えばベーター・ラクトグロブリン遺伝子の5'隣接プロモーター及び非コード領域を包括する約4.25kbp のDNA セグメントが好ましい。Whitelawら、Biochem J. 286 : 31-39 (1992) を参照のこと。その他の種由来の類似のフラグメントも適当である。

ベーター・ラクトグロブリン遺伝子のその他の領域も、発現すべき遺伝子のゲノム領域と同様に構築体に組込んでよい。イントロンを欠く構築体は、例えば、かかるDNA 配列を含むものと比べて弱く発現することが一般的に認識されている（Brinsterら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 836-840 (1988) ; Palmite r ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 478-482 (1991) ; Whitelaw ら、Transgenic Res. 1 : 3-13 (1991) ; WO 89/01343 ; 及び WO 91/02318を参照のこと；それぞれ引用することで本明細書に組入れる）。これに関連して、可能であれば、注目のタンパク質又はポリペプチドをコードする遺伝子の天然イントロン全体又はその一部を含むゲノム配列の利用が一般に好ましく、即ち、例えばベーター・ラクトグロブリン遺伝子由来の少なくともいくつかのイントロンの更なる組込みが好ましい。一のかかる領域はヒツジのベーター・ラクトグロブリン遺伝子の3'非コード領域に由来するイントロンのスプライシング及びRNA ポリア

デニル化を担うものである。遺伝子の天然3'非コード配列を置換した場合、このヒツジベーター・ラクトグロブリンセグメントは注目のタンパク質又はポリペプチドの発現レベルを高め、且つ安定化させる。その他の態様において、改良型VII因子配列の開始ATGを囲む領域を乳特異的タンパク質遺伝子由来

の対応の配列と置換してよい。かかる交換は発現性を高めるための推定の組織特異的開始環境を供する。改良型VII因子のプロンプト及び5'非コード配列全体を例えばBLG遺伝子で置換することが好都合であるが、より小さい領域を置換してもよい。

遺伝子導入動物における改良型VII因子の発現のため、改良型VII因子をコードするDNAセグメントを、その発現に必要な追加のDNAセグメントに作動連結させ、発現ユニットを作り上げるかかる追加のセグメントには、上記のプロモーター、並びにmRNAの転写及びポリアデニル化の終結を担う配列が含まれる。この発現ユニットは更に、改良型VII因子をコードするセグメントに作動連結した分泌シグナル配列をコードするDNAセグメントを含むであろう。この分泌シグナル配列は天然VII因子分泌シグナル配列であるか、又はその他のタンパク質、例えば乳タンパク質のそれであってよい。例えば、Von Heinje, *Nuc. Acids Res.* 14 : 4683-4690 (1986) ; 及びMeadeら、米国特許第 4,873,316号を参照のこと。これは引用することで本明細書に組入れる。

遺伝子導入動物において利用するための発現ユニットの構築は好都合には改良型VII因子配列を、追加のDNAセグメントを含むプラスミド又はファージベクターに挿入することにより好適に実施されるが、この発現ユニットは本質的に任意の配列のライゲーションによっても構築してよい。乳タンパク質をコードするDNAセグメントを含むベクターを用意し、そしてその乳タンパク質をコードする配列を改良型VII因子ポリペプチドと交換し、これにより乳タンパク質遺伝子の発現コントロール配列を含む遺伝子融合体を作成することが特に好都合である。いづれにせよ、プラスミド又はその他のベクターにおける発現ユニットのクローニングは改良型VII因子配列の増幅を助長する。増幅は好都合には細菌（例えばE. コリ）宿主細胞で

好適に実施し、かくしてベクターは細菌宿主細胞の中で機能する複製起点及び選択マーカーを一般に含むであろう。

次にこの発現ユニットを選定のホスト種の受精卵（初期段階の胎芽を含む）に導入する。異種DNAの導入は一又は複数のルート、例えばマイクロインジェクション（例えば、米国特許第4,873,191号）、レトロウィルス感染(Jaenisch, Science 240: 1468-1474(1988))又は胎芽幹(ES)細胞を利用する部位特異的組換(Bradleyら, Bio/Technology 10: 534-539(1992)により再考)により成し遂げられうる。次にその卵を偽似妊娠した雌の卵管又は子宮に移植し、そして出産させる。生殖系において導入DNAを担持する子孫は通常のメンデル方式でその子孫へとDNAを渡すことができ、遺伝子導入群の作成を可能にする。

遺伝子導入動物を作るための一般手順は当業界において公知である。例えば、Hoganら Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1986; Simonsら Bio/Technology 6: 179-183(1988); Wallら Biol. Reprod. 32: 645-651(1985); Buhlerら Bio/Technology 8: 140-143(1990); Ebertら Bio/Technology 9: 835-838(1991); Krimpenfortら Bio/Technology 9: 844-847(1991); Wallら J. Cell. Biochem. 49: 113-120(1992); 米国特許第4,873,191号及び4,873,316号; WIPO公開WO 88/00239, WO 90/05188, WO 92/11757; 及びGB 87/00458を参照のこと。これらは引用することで本明細書に組入れる。哺乳動物及びその生殖細胞への外来DNA配列の導入のための技術はマウスにおいて元来開発されている。例えばGordonら Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 7380-7384(1980); Gordon and Ruddle, Science 214: 1244-1246(1981); Palmiter and Brinster, Cell 41: 343-345(1985); Brinsterら Proc. Natl. Acad. S

ci. USA 82: 4438-4442(1985); 及びHoganら(前掲)を参照のこと。これらの技術はその後、家畜の種を含むより大型の動物への利用に応用されている(例えばWIPO公開WO 88/00239, WO 90/05188及びWO 92/11757; 並びに Simonsら Bio/Technology 6: 179-183(1988)を参照のこと)。まとめると、遺伝子導入マウス又は家畜の作成に今日まで利用されている最も効率的なルートにおいては、

注目のDNA の数百本の線形分子を確立された技術に従って受精卵の前核に注入する。接合体の細胞質へのDNA の注入も利用できる。遺伝子導入植物における生産も利用されうる。発現は全身系とするか、又は特定の器官、例えば結節へと特定してよい。Hiatt, Nature 344 : 469-479(1990); Edelbaumら J. Interferon Res. 12 : 449-453(1992); Sijmons ら Bio/Technology 8 : 217-221(1990); 及びヨーロッパ特許庁公開 EP 255,378 を参照のこと。

本発明に従って製造した改良型VII因子は抗VII因子抗体カラム上でのアフィニティークロマトグラフィーにより精製できうる。引用することで本明細書に組入れるWakabayashi ら J. Biol. Chem. 261 : 11097-11108(1986)及びThimら Biochem. 27 : 7785-7793 (1988) に記載のカルシウム依存性モノクローナル抗体の利用が特に好ましい。追加の精製は慣用の化学精製手段、例えば高性能液体クロマトグラフィーにより行われうる。その他の精製方法、例えばクエン酸バリウム沈殿が当業界に知られ、そして本明細書に記載の新規の改良型VII因子の精製に適用することができる(一般的には、Scopes, R., Protein Purification, Springer, Verlag, N. Y. 1982を参照のこと)。少なくとも約90~95%の均質性の、そして最も好ましくは98~99%又はそれより高い均質性の実質的に純粋な改良型VII因子が薬理学的用途にとって好ましい。部分的に、又は所望の均質性まで精製できたら、その改良型VII因子は治療的に利用できる。

本発明の一の態様において、その改良型VII因子はその活性部位において解裂されてその二本鎖形態へと変換する。活性化は当業界に公知の手順に従って行われることができ、その手順は例えば引用することで本明細書に組入れる、Osterud, ら Biochemistry 11 : 2853-2857 (1972) ; Thomasの米国特許第 4,456,591号 ; Hedner and Kisiel, J. Clin. Invest. 71: 1836-1841 (1983) ; 又はKisiel and Fujikawa, Behring Inst. Mitt. 73 : 29-42 (1983) に記載されている。得られる改良型「VIIa 因子」を以下の通りに配合して投与する。

本発明の改良型VII因子又はVIIa 因子分子及びその薬理組成物は血管内凝固に係る様々な症状を処置するためにヒトに投与するのに極めて有用である。例えば

、深遠血栓及び肺塞栓は慣用の抗凝固剤によって処置できうるが、本明細書に記載の改良型VII因子は危険性が高いと認められた患者、例えば手術を受ける者又はうっ血性心不全を有する者におけるトロンボ塞栓合併症の発症を予防するのに利用できる。更に、改良型VII因子は凝固の組織因子媒介誘発にとっての拮抗薬として働き、それ故トロンビンの生成及びその後のフィブリンの沈着を阻止することができる。従って、改良型VII因子は組織因子活性を阻害するのに有用であり得、凝血、血栓又は血小板沈着の阻害の如くの阻害をもたらす。

本発明の改良型VII因子は急性血管傷害に基づく内膜過形成及び再狭窄の処置において極めて有用でありうる。急性血管傷害は、生活時にわたって発症する慢性血管傷害（例えばアテローム症）とは対照的に、急速（即ち、数日から数ヶ月）に起こる。急性血管傷害は往々にして外科処置、例えば血管形成術、動脈血管内膜切除術、アテローム切除術、血管移植すえ付等を採用する技術である血管再構

成に由来する。過形成は例えば移植すえ付又は器官移植に応答する遅延型反応としても生じうる。改良型VII因子はヘパリンよりも選択性であり、一般に傷害部において露出している組織因子のみに結合し、そして改良型VII因子はその他の凝固タンパク質を破壊しないため、それを深遠静脈血栓の予防のために予防的に使用する際、ヘパリンよりも有効、且つ出血の合併症を引き起こす傾向が低いであろう。深遠静脈血栓の予防のための改良型VII因子の投与量は70kgの患者にとっては約50 $\mu$ g～500mg /日、より一般的には1mg～200mg /日、そしてより好ましくは10～175mg /日の範囲とし、そして投与は手術の少なくとも約6時間前から始め、そして少なくともその患者が動き回れるようになるまで続けるべきである。再狭窄にとっての処置における改良型VII因子の投与量は患者毎に変わるであろうが、一般に上記に提案した範囲であろう。

冠状血管障害の処置における近年の進歩には、冠状動脈を通して流れる適度な血流を再樹立するために邪魔なプラーク物質を排除又は除去する機械的介入の利用が含まれる。バルーン血管形成術、整復アテロール切除、血管ステントの設置、レーザー療法又はロトブレーターを含む様々な形式の機械的介入の利用にもか

かわらず、これらの技術の有用性は、処置後6ヶ月以内における約40%の再狭窄率により制約され続けている。

再狭窄は、血小板沈着及び血栓形成、化学走性及びミトゲン因子の放出、並びに血管平滑筋細胞の拡張動脈セグメントの内膜に至る移動及び増殖を含む生物学的過程の複雑な相互作用に由来するものと考えられている。

機械的傷害部位における血小板蓄積の阻害はヒト対象体における再狭窄率を抑えることができる。血小板GpIIb / IIIaに対するモノクローナル抗体の治療的利用はヒト対象体における再狭窄のレ

ベルを抑えることができる (Califfら, N. Engl. J. Med. 330 : 956-961 (1994))。この抗体は血小板の表層上のGpIIb / IIIaレセプターに結合することができ、それ故血小板の蓄積を阻害する。このデータは、ヒト冠状動脈における機械傷害の部位での血小板の蓄積の阻害が、最終的な治療応答が起こるのに有利であることを示唆する。血小板蓄積は急性血管傷害部位において起こるが、これらの部位での血栓の発生は血小板の活性化及びその後の蓄積にとっての原因となる。

以下の実施例において示している通り、本発明の改良型VII因子は細胞表層組織因子に結合することができる。例えば、DEGR-VIIa因子は細胞表層組織因子に、野生型VIIa因子と同等又は強い親和力で結合することができる。ところで、DEGR-VIIa因子は酵素活性を有さないが、それは組織因子に結合して野生型VIIa因子にとっての競合拮抗剤として作用し、それ故トロンビンの発生を招く凝固の外因性経路におけるその後の段階を阻害する。

組織因子を維持する本発明の改良型VII因子分子は、トロンビンの生成及びその後のフィブリンの沈着を阻止することにより、血管傷害部位での血小板蓄積を阻害する。

急性血管傷害部位においてトロンビン生成を阻止し、そして血小板沈着を抑えるDEGR-VII因子の能力に基づき、組織因子結合活性は維持しているが、VIIa因子の酵素活性は失われている改良型VII因子は血管再狭窄を阻止するのに利用できる。

かくして、本発明の組成物及び方法は多種多様な用途を有する。例えば、これらは治療、典型的にはバルーン血管形成術、整復アテローム切除術、血管ステントの設置、レーザー治療、ロトブレーション等と一緒に及び／又はそれらに後続して施す。冠状又は末梢血管障害の処置において妨害性のプラーク物質を除去又は排除する機

械的治療後の再狭窄を予防又は抑制するうえで有用である。この化合物は一般に治療を行う約24時間前以内に、そして少なくともその7日後まで投与されるであろう。投与は本明細書に更に記載の様々なルートを紹介する。本発明の化合物は全身的に、又は移植血管の設置のために局所的に（例えば、合成又は改良天然移植動脈血管のコーティングにより）、吻合部位、動脈血管内脈切除部位（一般には頸動脈内膜切除部位）、バイパス移植部位等に投与してもよい。この改良型VI I及びVII a 因子は例えば骨髄移植を経た器官移植に係る内膜過形成、加速型アテローム症及び静脈血栓症を抑制するうえでも有用である。

確立された深遠静脈血栓及び／又は肺塞栓症において、患者の体重及び症状の重度に依存して、負荷投与及び維持投与して、70kgの患者当り改良型VII 因子の投与量は約50 $\mu$ g～500mg、より一般には1mg～200mg /日、そしてより好ましくは10mg～約175mg /日に範囲する。改良型VII 因子点滴に由来する出血合併症の傾向の低さを理由に、血栓症又は塞栓症に係る手術の最中又は後において改良型VII 因子はヘパリンにとって代わるか又はヘパリンの投与量を下げることができる。

本発明の改良型VII 因子組成物は心臓の塞栓の予防及び血栓発作の処置においてもかなりの有用性を有するであろう。出血合併症を起こす可能性の低さ及びその選択性を理由に、改良型VII 因子は発作の患者に与えることができ、そして閉塞性の動脈血栓の継続を阻止することができる。投与する改良型VII 因子の量は発作の性質及び重度に依存して患者毎に変わるであろうが、しかしその投与量は一般に以下に提唱する範囲であろう。

DEGR VII 因子を含むここに提供する改良型VII 因子の薬理組成物はその改良型VII 因子のインビボ凝固を阻害する能力を理由に急性心筋



梗塞における有用な処置をなすであろう。改良型VII因子は急性心筋梗塞期の最中に組織プラスミノゲンアクチベーター又はストレプトキナーゼと一緒に与えてよく、そしてTPA誘導型血栓溶解を促進しうる。急性心筋梗塞において、その患者には70kgの患者当り、負荷及び維持投与として少なくとも約 $50\mu\text{g}\sim 500\text{mg}$  / 日、より一般には $1\text{mg}\sim 200\text{mg}$  / 日、そしてより好ましくは $10\text{mg}\sim 175\text{mg}$  / 日の負荷投与量を与えてよい。改良型VII因子は、組織プラスミノゲンアクチベーターの如き血栓溶解剤の投与の前、それと一緒に、又はすぐ後に与える。

本発明の改良型VII因子は散在性血管内凝固(DIC)及びグラム陰性菌血症の関与するその他の症状の処置において有用である。DICの特徴をもつ患者は広がり渡った微小循環血栓を有し、そして往々にして必須の凝塊因子の消費をもたらす重度な出血の問題を有する。その選択性を理由に、改良型VII因子は慣用の抗凝固剤のようにDICに係る出血の問題を悪化させず、しかも更なる微小血管フィブリン沈着の形成を抑える又は阻害するであろう。従って、DEGR-VII因子及びDEGR-VIIa因子を含む本発明の改良型VII因子は内毒血症及び内毒素ショックに結びつくフィブリン沈着の抑制において有用であり、それ故グラム陰性菌血症に係る作用を緩和もする。DEGR-VIIa因子はウサギで腎臓及び肺におけるフィブリン沈着を阻止する用量反応性効果を発揮し、そしてヒトにおいては処置動物の延命効果を発揮した。急性菌血症、内毒血症又はDICの場合、70kgの患者当り、患者に少なくとも約 $50\mu\text{g}\sim 500\text{mg}$  / 日、より一般には $1\text{mg}\sim 200\text{mg}$  / 日、そしてより好ましくは $10\text{mg}\sim 175\text{mg}$  / 日の負荷投与量を与え、それに70kgの患者当り $50\mu\text{g}\sim 500\text{mg}$  / 日、一般には $1\text{mg}\sim 200\text{mg}$  / 日の範囲の維持投与を続ける。

この薬理組成物は予防的及び／又は治療的処置のための非経口的

、局所的又は局在的投与を意図する。好ましくは、この薬理組成物は非経口的に、即ち、静脈内的に皮下的に、又は筋肉内的に投与する。即ち、本発明は許容の担体、好ましくは水性担体の中に溶解された改良型VII因子分子の溶液を含んで成る非経口投与用の組成物を提供する。様々な水性担体、例えば水、緩衝水、0.4%の食塩水、0.3%のグリシン等を使用してよい。この改良型VII因子分子は傷害部位に輸送又はそれを標的化するためにリボソーム製剤へと処方してよい。リ

ボソーム製剤は一般に例えば引用することで本明細書に組入れる米国特許第 4,837,028号、米国特許第 4,501,728号及び米国特許第 4,975,282号に記載されている。この組成物は慣用のよく知られた滅菌技術によって滅菌してよい。得られる水性溶液を使用のために包装するか、又は無菌条件下で濾過し、次いで凍結乾燥してよく、その凍結乾燥製剤は投与前に滅菌水性溶液と混合する。この組成物は生理学的状態に近づけるのに必要な薬理学的に許容されている補助剤、例えばpH調整剤及び緩衝剤、等張性調整剤等、例えば酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム等を含んでよい。これらの製剤中の改良型VII因子の濃度は幅広く変えてよく、即ち約 0.5重量%の低さから、通常は約 1 重量%以上から、15又は20重量%の高さに至ってよく、そしてそれは主に選定した投与の特定態様に従って流体容積、粘度等により選定されるであろう。

従って、静脈内点滴のための典型的な薬理組成物は 250mlの滅菌Ringer溶液と、10mgの改良型VII因子とを含むように調製してよい。非経口投与用化合物を調製するための実際の方法は当業者に公知又は自明であり、そして例えば引用することで本明細書に組入れる Remington's Pharmacuticul Science 第16版, Mack Publishing Company - Easton, PA (1982) に詳細されている。

改良型VII因子分子を含む組成物は予防的及び／又は治療的処置のために投与してよい。治療的用途においては、既に障害に苦しんでいる患者に組成物を前記の通りにして、その障害及び合併症を治癒又は少なくとも緩和するのに足りる量で投与する。これを成し遂げるのに適当な量を「治療的に有効な投与量」と定義する。この用途にとって効果的な量は障害又は傷害の重度、並びに患者の体重及び健康状態に依存するであろうが、しかし一般には70kgの患者にとっては1日当り約0.05mg～約500mg の改良型VII因子に範囲し、1日当り約 1.0mg～約200mg の改良型VII因子の投与量がより一般的に利用される。本発明の材料は一般に重症な障害又は傷害状況、即ち、生命が脅かされている又は潜在的に生命を脅かしている状況において採用されうることを念頭に置かねばならない。かかるケースにおいて、外因性物質の最少限化及びヒトにおける改良型ヒトVII因子の免疫原

性の一般的な欠如の観点から、処置医師は実質的に過剰な量のこれらの改良型VI因子組成物を投与することが可能であり、そして所望しうる。

予防的用途においては、この改良型VII因子を含む組成物を障害又は傷害にかかり易い又はその危険性にある患者に、その患者自身の抗凝固能を高めるように投与する。かかる量は「予防的に有効な投与量」と定義する。この用途においては、ここでもその正確な量は患者の健康状態及び体重に依存するが、しかし一般には70kgの患者当たり約0.05mg～500mgに範囲し、より一般的には70kgの体重当たり約1.0mg～約200mgであろう。

一回又は数回にわたるこの組成物の投与を、処置医師により選定される投与レベル及びパターンで実施することができる。毎日の維持レベルを必要とする動きまわられる患者にとっては、例えばこの改良型VII因子はポータブル式ポンプシステムの如くを用いる連続点滴

により投与してよい。

改良型VII因子の局所導入は、例えばパーフュージョン、ダブルバルーンカテーテル、ステント又はその他のよく樹立された方法により実施できうる。いかなる状況においても、この薬理製剤は患者を効果的に処置するのに足りる量の本発明の改良型VII因子を供すべきであろう。

以下の実施例を、限定することなく例示のために提供する。

#### 実施例 I

##### Ser<sub>344</sub>→Ala<sub>344</sub> VII因子の発現

Ser<sub>344</sub>→Ala VII因子活性部位突然変異体を作るため、プラスミドFVII (565 + 2463) / pDX (引用することで本明細書に組入れる米国特許第 4,784,950号; アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに受託番号 40205で寄託) を Xba I 及び Kpn I で消化し、そして得られるセリン344 についてのコード領域を含んで成る 0.6kbのフラグメントを回収した。このフラグメントを図に示している Xba I , Kpn I -消化 M13mp19にクローンした。この操作及び以下に説明するその後の工程は一般に標準のプロトコールに従って行った(例えば、Maniatisら, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Pr

ess, Cold Spring Harbor, N. Y. (1982) ; 引用することで本明細書に組入れる ; に記載の通り)。

突然変異誘発はM13鑄型に基づき、Zoller and Smith前掲の方法に従い、突然変異用オリゴヌクレオチドZC 1656 (5' TGG GCC TCC GGC GTC CCC CTT 3') 及び「万能」第二プライマーZC 87 (5' TCC CAG TCA CGA CGT 3') を用いて行った。反応生成物をキナーゼ処理したZC 1656 を用いてスクリーンした。陽性プラークを拾

い、そして鑄型DNA を用意し、そして1077にある Pst I 部位から1213にある Kpn I 部位に至るまで配列決定した。配列分析は所望の突然変異の存在を確認せしめた。この突然変異クローンを1656と命名した。

次いで発現ベクターを1656クローンをを用いて構築した。この突然変異配列をM13ベクターから、~0.14kbの Pst I - Kpn I フラグメントとして単離した。このフラグメントをF VII (565 + 2463) / pDX 由来の 1.7kbのHindIII - Xba I フラグメント、F VII (565 + 2463) / pDX 由来の 0.5kbの Xba I - Pst I フラグメント及びF VII (565 + 2463) / pDX 由来の 4.3kbの Kpn I - HindIIIフラグメントに、図に示している通りにリゲートさせた。所望の突然変異配列の存在は突然変異体及び野生型クローンを Pst I で消化し、そして突然変異VII因子をM13の中に Kpn I 及び Xba I を用いて挿入し、消化DNAのサザンブロットを用意し、次いでそのブロットをラジオリベル化ZC 1656 でプローブすることによって確認した。

ベビーハムスター腎細胞系BHK 570 (アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに受託番号10314で寄託) に1656発現ベクターの2つの単離物( #544 及び#545 と命名) をトランスフェクトした。この細胞はBHK 570 細胞の集密10 cmプレート(非選択培地(10%の胎児牛血清及び1%のPSN 抗生物質ミックス〔GIBCO Life Technologies, Gaithersburg, MD〕を含むDulbeccoの改良Eagle 培地〔DMEM〕)の中に5枚の10cmプレートに1:10で希釈することにより用意した。24時間後、細胞が20~30%の集密度に達したとき、それらを1656突然変異をコードする発現ベクターの一種の単離体プラスミドp486 (アデノウィルス5 ori, S

V 40エンハンサー、アデノウィルス2主要後期プロモーター、アデノウィルス2三分節系リーダー、5'及び3'スプライス部位、DHFR<sup>r</sup> cDNA及びSV 40 ポリア

デニル化シグナル (pML - 1 [Lusky and Botchan, Nature, 293: 79-81 (1981)] 中) を含んで成る) 並びに10 $\mu$ gのキャリアーDNA (音波処理したサケ精子DNA) により、表1に示す通りに同時トランスフェクトした。DNAを15mlのチューブに入れ、次いで0.5mlの2X Hepes (25gのHepes, 40gのNaCl, 1.8gのKCl, 0.75gのNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 5gのデキストロース; 蒸留水で2.5lにまで希釈し、そしてpH6.95~7.0に調整) を加え、そしてそのチューブを混合した。各チューブ中のDNAを0.25MのCaCl<sub>2</sub> 0.5mlの添加、それと同時にそのDNA/Hepes溶液にパスツールピペットを用いて空気を吹き込むことにより沈殿させた。そのチューブをボルテックスにかけ、室温で15分インキュベートし、そして再びボルテックスにかけた。そのDNA混合物を次にピペットで細胞のプレート上に滴下した。そのプレートをゆらし、そして37℃で4~6時間インキュベートした。インキュベーション後、トリス-食塩水 (0.375gのKCl, 0.71gのNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8.1gのNaCl, 3.0gのトリス-HCl, 0.5gのスクロース; 全部で1リットルに希釈し、そしてpHをpH7.9に調整) の中に希釈した20%のグリセロール2mlを各プレートに加えた。このプレートをゆらし、そして室温に2分放置した。次いでそのプレートから培地を除き、そしてトリス-食塩水2mlに置き換えた。そのプレートを室温で2分放置し、次いでトリス食塩水を除去し、そして10mlの非選択培地に置き換えた。そのプレートを37℃で2日間インキュベートした。

表 1  
トランスフェクション\*

	544	545	544 Control	545 Control
<u>プラスミド名</u>				
クローン544	15 $\mu$ l	---	15 $\mu$ l	---
クローン545	---	30 $\mu$ l	---	30 $\mu$ l
p 486	1.5 $\mu$ l	1.5 $\mu$ l	---	---
キャリアーDNA	1.6 $\mu$ l	1.6 $\mu$ l	1.6 $\mu$ l	1.6 $\mu$ l

\* 使用したDNA 濃度は：クローン544, 0.7  $\mu$  g /  $\mu$  l ;  
クローン545, 0.3  $\mu$  g /  $\mu$  l ; p 486, 1.49  $\mu$  g /  $\mu$  l 。

2日間のインキュベーション後、この細胞を選択培地（10%の透析胎児牛血清、1%のPSN 抗生物質ミックス及び 150nMのメトトレキセートを含むDMEM）の中に希釈し、そしてmaxiプレートの中に1：100, 1：250 及び1：500 の希釈率でプレートした。これらのプレートを37℃で1週間インキュベートした。1週間後、その培地を選択培地に交換し、そしてそのプレートをコロニー形成についてチェックした。

8日後、コロニー形成を経て、12のコロニーを#544 及び#545 トランスフェクションプレートの1：500 の希釈プレートからランダムに選択した。各クローンを6穴プレートの1のウェルの中に入れ、そして選択培地の中で増殖させた。7日後、それらのプレートは集密となり、そしてそれらのプレートを選択培地において10cmのプレートにそれぞれ分割した。

上記のクローン及び野生型VII因子を発現するようにトランスフェクトされたコントロール細胞を $^{35}$ S-メチオニン-システインタンパク質ラベル用混合物(NEN Dupont Biotechnology Systems, Wilmington DE)で代謝ラベルした。これらのクローンを選択培地の中で

のパルスラベル実験のために増殖させて用意した。その細胞をリン酸緩衝食塩水（Sigma, St. Louis, MO）ですすぎ、そして20  $\mu$  Ci / mlの $^{35}$ S-Cys-  $^{35}$ S-Metの中で4時間パルスに付した。4時間後、上清液及び細胞を回収した。その細胞を

Lenk and Penman(Cell 16 : 289 - 302, (1979))に本質的に記載の通りに溶解し、そして 400 $\mu$ l づつのリゼートを50 $\mu$ l のstaph A (Sigma, St. Louis, MO) で予備清浄した。

代謝ラベルした細胞由来のサンプルを、まずそのサンプルを6 $\mu$ l の抗-VII 因子ポリクローナル抗血清と4時間インキュベートすることによりラジオ免疫沈殿(RIP)させた。60 $\mu$ l の洗浄スタフィロコッカス・プロテインAを各サンプルに加え、そしてそのサンプルを4℃で1.5時間ゆらした。このサンプルを遠心し、そしてその上清液を除去した。このペレットを0.7MのRIPAバッファー(10mMのトリス、pH7.4、1%のデオキシコール酸[Calbiochem Corp., La Jolla, CA]、1%のトリトンX-100、0.1%のSDS、5mMのEDTA、0.7MのNaCl)で2回、そして0.15MのRIPAバッファー(10mMのトリス、pH7.4、1%のデオキシコール酸[Calbiochem Corp., La Jolla, CA]、1%のトリトンX-100、0.1%のSDS、5mMのEDTA、0.15MのNaCl)で1回洗った。100 $\mu$ l の1XのSDS染料(50mMのトリス-HCl, pH6.8, 100mMのジチオスレイトール、2%のSDS、0.1%のプロモフェノールブルー、10%のグリセロール)を各サンプルに加え、そしてそのサンプルを5分煮沸し、そして遠心してプロテインAを除いた。50 $\mu$ l づつの各サンプルを10%のポリアクリルアミドゲルで泳動させた。結果は、10クローンのうち9クローンが改良型VII因子を分泌することを示した。

#### 実施例II

##### 改良型VII因子の抗凝固活性

改良型VII因子タンパク質の凝塊を阻害する能力をコントロールとして野生型VII因子を用いる一段凝塊アッセイで測定した。組換タンパク質は5 $\mu$ g/mlのビタミンKを含む培地の中で培養した細胞から本質的に上記の通りに調製した。様々な量の改良型VII因子(クローン544由来)又は組換野生型VII因子を50mMのトリスpH7.5, 0.1%のBSAの中で100 $\mu$ lとなるように希釈した。その混合物を100 $\mu$ lのVII因子欠損血漿(George King Bio-Medical Inc., Overland Park, KS)及び200 $\mu$ lのトロンボプラスチンC(Dade, Miami, FL;ウサギ脳トロンボプラスチン及び11.8mMのCa<sup>++</sup>を含む)とインキュベートした。凝塊アッセイは自動

凝塊タイマー (MLA Electra 800, Medical Laborator, Automation Inc., Pleasantville, NY) で行い、そして凝塊時間を 1 : 5 ~ 1 : 640 の希釈率の正常プールヒト血漿 (1 単位 / ml の VII 因子活性を確実に含むようにしてある ; 健康なドナー由来のクエン酸処理血清をプールすることにより調製) で作製した。標準曲線を用いて VII 因子活性単位に変換させた。このアッセイを利用すると、改良型 VII 因子の調製品は検出可能な凝固活性を示さなかった。表 2 はコントロール (未トランスフェクト) BHK 細胞コンデーション化培地 (+ / - ビタミン K)、野生型 VII 因子及び改良型 VIII 因子を発現する 2 種の細胞単離体についての凝塊時間についてのアッセイ結果を示す。VII 因子活性はコントロールサンプルに比べて凝塊時間を短縮するようである。

表 2

<u>サンプル</u>	<u>希釈率</u>	<u>凝塊時間 (sec.)</u>
コントロール + K	1 : 5	33.1
	1 : 10	33.4
コントロール - K	1 : 5	34.3
	1 : 10	33.2
野生型 VII 因子	1 : 20	19.0
	1 : 40	21.5
	1 : 80	23.3
改良型 VII 因子 (# 6)	1 : 1	33.5
改良型 VII 因子 (# 10)	1 : 1	32.5

血漿因子基質に及ぼす改良型 VII 因子の効果を調べるため、改良型 VII 因子及び組換え野生型又は天然 VII 因子の調製品を X 因子又は IX 因子のいずれかとインキュベートし、そしてその活性化を凝塊アッセイ又はポリアクリルアミドゲル電気泳動によりモニターした。



### 実施例III

#### 組織因子に結合する改良型VII因子の能力

改良型VII因子の、組織因子に対しての野生型VII因子と競合する能力及びその凝塊活性を阻害する能力を規定量の組織因子（トロンボプラスチン）の存在下での一段凝塊アッセイで評価した。

凝塊時間は実施例IIに記載と類似の一段アッセイにおいて決定した。規定量の組織因子、一定量の野生型VII因子及び上昇していく量のVII因子変異体を混合実験において用いた。VII/VIIa 因子プロ凝固

活性の阻害は、上昇していく量のVII因子変異体を含むアッセイにおいて、凝塊時間の増大として認められるであろう。

試験サンプル中のVII因子活性の値は、正常プール血漿中のVII因子活性を測定せしめる標準曲線のパーセンテージとして計算した。VII因子活性についての標準曲線は、1：5から1：640に範囲するリン酸緩衝溶液(PBS)中での正常プール血漿の希釈系列を用いて作製した。この目的のため、正常血漿が約500ng/mlのVII因子を含むことを確実にしておき、そしてこれを1単位の活性と考慮した。100 $\mu$ lのVII因子欠損血漿、100 $\mu$ lの血漿希釈品及び200 $\mu$ lのトロンボプラスチン-C (Dade, Miami, FL)の混合物をMLA Electra 800 自動タイマーで凝塊時間を測定するために用いた。標準曲線を樹立するため、この結果を活性のパーセンテージ（1：5 = 100% 活性）対、秒における凝塊時間としてグラフにした。

このアッセイは、野生型及びVII因子変異体を含む培地が1%未満の血清より成ることを必要とする。希釈をPBSで行い、これによりその凝塊時間が標準曲線に載るようにした。1：2の最少希釈率が一般的である。最終容量は100 $\mu$ lとした。クローン「#10」及び「#6」と命名する2種類のヒトVII因子Ser<sub>344</sub>→Ala 変異体をこの実験において試験した。以下の表に記載のその結果は、VII因子の量が増大すると、VIIa 因子の活性のパーセンテージが低下することも示した。

表3 : Ser<sub>344</sub>→Ala 変異体による混合アッセイの結果(B4A1 (野生型) 培地を 100% 活性として 10  $\mu$  l / 反応で使用)

Ser <sub>344</sub> →Ala クローンNo.	変異体 培地量	B4A1 培地量	BHK コント ロール*	パーセント F VII <sub>a</sub> 活 性
# 10	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	0	70
# 10	20 $\mu$ l	10 $\mu$ l	0	51
# 10	30 $\mu$ l	10 $\mu$ l	0	43
# 10	40 $\mu$ l	10 $\mu$ l	0	34
# 10	50 $\mu$ l	10 $\mu$ l	0	28
# 10 (-K) <sup>§</sup>	20 $\mu$ l	10 $\mu$ l	0	78
# 6	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l	0	74
# 6	20 $\mu$ l	10 $\mu$ l	0	56
# 6	30 $\mu$ l	10 $\mu$ l	0	46
# 6	40 $\mu$ l	10 $\mu$ l	0	41
# 6	50 $\mu$ l	10 $\mu$ l	0	32
# 6 (-K)	20 $\mu$ l	10 $\mu$ l	0	85
BHK コントロール	0	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l	91
BHK コントロール(-K)	0	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l	107

\* 未トランスフェクト・コンディション化培地

§ VII因子変異体の発現のため、「(-K)」と記している場合  
を除き、細胞はビタミンKの存在下に増殖

これらの実験は、Ser<sub>344</sub>→Ala 置換を有するVII因子の変異体が、投与量依存性状況で天然VII因子と競合し、そして天然VII/VIIa 因子のプロ凝固活性を阻害することを示した。従って、Ser<sub>344</sub>→Ala ヒトVII因子変異体は天然ヒトVIIa 因子と競合し、そして結果としてヒト血漿中のX及び/又はIX因子の活性化を阻害するものと考えられ

うる。

## 実施例IV

### PPACK とのVII因子の反応

組換VII因子をトランスフェクトベビーハムスター腎細胞の中で製造させた。このタンパク質を引用することで本明細書に組入れるThimら (Biochemistry 27 : 7785-7793, 1988)、Brinkousら (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 1382-1386, 1989) 及びBjoern and Thim (Res. Discl. No. 269, 564, 1986)に記載の通りにして精製及び活性化させた。その細胞培養培地を回収し、濾過し、そして希釈して販売時の濃度を下げた。この希釈培地を次にCaCl<sub>2</sub>含有溶離用バッファーを用い、アニオン交換クロマトグラフィーにより分画した。VII因子画分を回収し、そしてカルシウム依存性抗-VII因子モノクローナル抗体を用いるイムノクロマトグラフィーにより更に精製した。更なる精製を2段式アニオン交換クロマトグラフィー工程を利用して実施し、ここでVII因子をCaCl<sub>2</sub>及びNaClのそれぞれを用いて溶離させた。VIIa因子を最終溶離液から回収した。

50mMのトリス-HCl, 100mMのNaCl, 5mMのCaCl<sub>2</sub>, pH7.4中の組換VIIa因子 (1  $\mu$ M) を20  $\mu$ MのPPack (D-フェニルアラニル-プロリル-アルギニルクロメチルケトン; Calbiochem, La Jolla, CA) と5, 20及び60分インキュベートした。次に発色原基質S 2288 (H-D-イソロイシン-レ-プロリル-レ-アルギニン-p-ニトロアニリド; Kabi Vitrum AB, Molndal, Sweden)を含むバッファーを加えて2.5倍の希釈率及び0.3mMのS 2288の最終濃度とした。p-ニトロアニリンの生成を測定し、そしてコントロールとして未処理VIIa因子を用いた結果と比較した。その結果は、VIIa因子がこれらの反応条件下で60分後に完全に失活することも示した。

### 実施例V

#### DEGR-VIIa因子の生成

組換ヒトVIIa因子を実施例IVに記載の通りにして調製した。10mMのグリシンバッファー、pH8.0, 10mMのCaCl<sub>2</sub>, 50mMのNaCl中の組換VIIa因子を1.5mg/mlの濃度に希釈した。蒸留H<sub>2</sub>Oに溶解しておいた10倍過剰モル量のダンシル- $\text{L}$ -Glu-Gly-Arg-クロメチルケトン、DEGRcK (Calbiochem, La Jolla, CA 92037) をVIIa因子は加えた。37°Cで2hのインキュベーション後、第2の10倍過剰

モル量のDEGRcKをこの混合物に加え、そして37℃で更に2時間インキュベートした。第3の10倍過剰モル量のDEGRcKをVIIa因子に加え、そして4℃で約16時間インキュベートした。次にDEGR-VIIa因子サンプルをトリス緩衝食塩水(0.05Mのトリス-HCl, 0.1MのNaCl, pH7.5)に対して4℃で十分に透析した遊離のDEGRcKを全て除いた。

この最終DEGR-VIIa因子混合物をXa因子発色原基質アッセイにおいて遊離DEGRcKの存在について試験した。このDEGR-VIIa因子混合物を精製ヒトXa因子に、発色原基質S-2222と一緒に加えた。この混合物中の未結合DEGRcKはXa因子に結合することができ、それ故Xa因子の発色活性を阻害できる。遊離DEGRcKをXa因子混合物にスパイクすることは、溶液中の遊離DEGRcKのレベル、対、Xa因子発色活性の阻害を測定するための標準曲線をもたらす。DEGR-VIIa因子混合物の分析は、遊離DEGRcK: DEGR-VIIa因子の比が長期透析を経て0.5%未満となることを示し、それ故以下に記載の様々なアッセイ系におけるDEGR-VIIa因子により認められる阻害は遊離DEGRcKの存在に基づくものでないことを保障する。

#### 実施例VI

##### ラットの平滑筋細胞上でのXa因子の作製

血管の平滑筋細胞を細胞表層組織因子の存在について、X因子のXa因子への変換を刺激するその細胞の能力をXa因子に特異的な

発色原基質を用いて測定することによって分析した。

ラットの血管平滑筋細胞(Clowesら, J. Clin. Invest, 93: 644-651(1994))を96穴培養ディッシュ(American Scientific Products, Chicago, IL)に、増殖培地(表4)においてウェル当り8,000細胞でプレートした。

表 4

500ml の Dulbecco 改良 Eagle 培地 (DMEM) (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD.)

10% の胎児牛血清 (Hyclone, Logan, UT.)

1 mM のピルビン酸ナトリウム (Irvine, Santa Ana, CA.)

0.29mg/ml の L-グルタミン (Hazelton, Lenexa, KS.)

1 × の PSN ; (100X は 5 mg/ml のペニシリン、5 mg/ml のストレプトマイシン、10mg/ml のネオマイシン) (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD.)

37℃ で 48 時間のインキュベーション後、その培地を無血清培地と交換した (表 5)。

表 5

250ml の Dulbecco 改良 Eagle 培地 (DMEM)

250Mml の Ham F-12 培地 (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA)

1 mM のピルビン酸ナトリウム

.29 mg/ml の L-グルタミン

20  $\mu$  M のトランスフェリン (JRH, Lenexa, KS.)

5  $\mu$  M のインスリン (GIBCO-BRL)

16ng のセレニウム (Aldrich, Milwaukee, WI.)

1 mg/ml の牛血清アルブミン (Sigma, St. Louis, MO)

これらの細胞を 37℃ で 7 時間インキュベートした。インキュベ-

ション後、PDGF-BB (10ng/ml) 又は 10% の胎児牛血清を細胞に加えて組織因子発現を刺激した (Taubman ら, J. Clin. Invest. 91: 547 - 552, 1993)。一組の平行セットの細胞には、未刺激細胞の固有活性についてモニターするため、PDGF 又は血清のいずれも与えなかった。6 時間のインキュベーション後、組換えヒト VIIa 因子を細胞に 10nM の最終濃度で加えた。一セットの細胞は陰性コントロールとして、VIIa 因子は加えていない。この細胞を 37℃ で 2 時間インキュベートし

、そしてHEPES バッファー(10mMのHEPES, 137mMのNaCl, 4 mMのKCl, 5 mMのCaCl<sub>2</sub>, 11mMのグルコース、0.1%のBSA)で洗った。洗浄後、細胞を5 mMのCaCl<sub>2</sub>の添加したトリス緩衝食塩水中の50ml/ウェルの 200nMの血漿精製ヒトX因子とインキュベートした。25 $\mu$ lの 0.5MのEDTA及び25 $\mu$ lの 800 $\mu$ MのS-2222発色原基質溶液(Kabi Pharmacia, Franklin, OH)を各ウェルに加えた。これらのプレートを室温で40分インキュベートし、次いでTHERMO MAX Microplate Reader (Molecular Devices, Menlo Park, (A))を用い 405nmで分析した。

表6はVIIa因子処理ウェルの、コントロールウェル(VIIa因子を添加していない)に比しての吸収の上昇を示す。吸収の上昇はウェルの中で生成したXa因子のレベル及び発色団を放出せしめる発色原基質のその後の解裂の測定値である。このデータは、PDGF-BB又は10%の胎児牛血清のいずれかに処理した細胞における発色活性のレベルが未刺激細胞より高いことも示している。

表 6

試験サンプル	OD <sub>405</sub>
コントロール	.043
固 有	.247
PDGF-BB	.360
10% FCS	.342

これらの結果は、ラットの血管平滑筋細胞の細胞表層上でX因子からXa因子に至るVIIa因子存在性活性化があることを明確に示している。

#### 実施例VII

##### DEGR-VIIa因子による細胞表層発色活性の阻害

ラットの血管平滑筋細胞を上記の通りにして96穴培養ディッシュにプレートした。これらの細胞を上記の無血清培地の中で72時間培養し、そして10%の胎児牛血清を添加して6時間処理し、組織因子発現を刺激した。刺激後、バッファーのみ(コントロール)、10nMのVIIa因子又は10nMのVIIa因子+ 100nMのDEGR-VIIa因子を各ウェルに加えた。この細胞を37℃で2時間インキュベートし、次いでHEPES バッファーで洗った。洗浄後、これらの細胞を50 $\mu$ l/ウェルの 200nM

のX因子(5 mMのCaCl<sub>2</sub>の添加されたトリス緩衝食塩水中)と5分間インキュベートした。25 $\mu$ lの0.5MのEDTA及び25 $\mu$ lのS-2222(800 $\mu$ M)発色原基質(Kabi Pharmacia)を各ウェルに加えた。この細胞を室温で40分インキュベートした。発色活性を上記の通りにして405nmで分析した。

表7は、VIIa因子のみで処理したウェルにおける発色活性の刺激、及びDEGR-VIIa因子をVIIa因子と一緒にインキュベートしたときの刺激の阻害を示す。これらの結果は、DEGR-VIIa因子がVIIa因子結合にとっての競合的拮抗剤として働き、それ故X因子のXa因子

に至る活性化を阻害し、その後のS-2222発色現の解裂を阻害することを示している。

表 7

試験サンプル	OD <sub>405</sub>
コントロール	.035
VIIa因子	.342
VIIa因子+DEGR-VIIa因子	.073

#### 実施例VIII

##### ラットの平滑筋細胞上での細胞表層発色活性のDEGR-VIIa因子による投与量依存性阻害

ラットの血管平滑筋細胞を96穴培養皿の中に4,000細胞/ウェルにおいて、1%の胎児牛血清の添加した増殖培地の中でプレートした(表4に記載の10%の胎児牛血清でなく)、5日後、その培地を除去し、そして上昇していく濃度のVIIa因子のみ、又は10nMのVIIa因子と上昇していく濃度のDEGR-VIIa因子を細胞に加えた。この細胞をVII因子混合物と37℃で2時間インキュベートした。インキュベーション後、その細胞を洗い、そしてトリス緩衝食塩水中の200nMのX因子50 $\mu$ lと室温で5分インキュベートした。各ウェルに0.5MのEDTA 25 $\mu$ l及び800 $\mu$ MのS-2222(Kabi Pharmacia)25 $\mu$ lを加え、そしてそのプレートを室温で40分インキュベートした。発色活性を上記の通りにしてマイクロタイタープレートリーダーで405nmで分析した。

表8は、ウェルに加えるVIIa因子の量の上昇に伴う発色活性の投与量依存性上昇を示す。DEGR-VIIa因子と100nMのVIIa因子との混合物を細胞に加えると(表9)、発色活性における投与量依存性阻害が起こる。1:1のモル比のDEGR-VIIa因子:VIIa因子は約95%の発色活性を阻害した。これらのデータは、DEGR-VIIa因子が天

然VIIa因子よりも細胞表層組織因子に対する。有意に高い親和力を有していることを示している。もしDEGR-VIIa因子及びVIIa因子が組織因子に対して同等の親和力を有するなら、これらの2種の分子を等モル比で加えたときに観察される阻害レベルはそれほど高くないであろう。

表 8

VII a 因子濃度 (nM)	OD <sub>405</sub>
.10	.005
.39	.025
1.56	.058
6.25	.111
25.00	.154
100.00	.208

表9はDEGR-VIIa因子によるラットの平滑筋細胞上でのXa因子発色活性の投与量依存性阻害を示す。上昇していく濃度のDEGR-VIIa因子を100nMのVIIa因子と一緒にインキュベートし、そしてXa因子発色活性を発色原基質S-2222を用いて決定した。



表 9

DEGR-VII a 因子濃度 (nM)	OD <sub>405</sub>
.00	.208
.39	.176
1.56	.116
6.25	.073
25.00	.026
100.00	.014

実施例 IX可溶性組織因子アッセイでの DEGR-VII a 因子による X a 因子生成の阻害

精製組換え可溶性組織因子を用いる X 因子の X a 因子に至る変換を発色アッセイを用いて確立した。組織因子をサッカロマイセス・セレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*) (Shigematsu ら, J. Biol. Chem. 267 : 21329-21337, 1992) から発現及び精製した。可溶性組織因子は Dr. Walt Kisiel (New Mexico 大学、Albuquerque, NM) により精製及び特性化されている、65.9  $\mu$ l の可溶性組織因子 (2.2  $\mu$ M)、29.0  $\mu$ l の PCPS (1 mM, Sigma, St. Louis, MO)、29.5  $\mu$ l の ヒト X 因子 (4.1  $\mu$ M)、2.77ml の Hank バッファー (25mM の トリス、pH7.4, 150mM の NaCl, 2.7 mM の KCl, 5 mM の CaCl<sub>2</sub>, 0.1% の BSA) を含む反応混合物を調製した。40  $\mu$ l の組織因子 / X 因子混合物、TBS で希釈した 25  $\mu$ l の VII a 因子、及び TBS で希釈した 25  $\mu$ l の DEGR-VII a 因子の 96 穴マイクロタイタープレートの各ウェルに加えた。10  $\mu$ l の S-2222 (4 mM) 発色原基質をウェル中の反応混合物に加え、そして室温で 2~10 分インキュベートした。結果は上記の通りにしてマイクロタイタープレートリーダーで 405nm で分析した。

X 因子の VII a 因子活性化についての標準曲線の決定を、DEGR-VII a 因子の非存在下で加える上昇していく濃度の VII a 因子を用いて行った。表 10 に示す結果は、反応混合物に加える VII a 因子の量の増大に伴い、発色活性の投与量依存性上昇があることを示す。様々な量の DEGR-VII a 因子及び 100nM の VII a 因子の同

時添加は発色活性における投与量依存性低下を招いた(表11)。これらのデータは、DEGR-VII a 因子が可溶性組織因子に対する天然VII a 因子の結合にとっての競合的拮抗剤として働き、それ故発色原基質S-2222に対する発色活性における低下により測定される通り、X a 因子の生成を阻害することを示す。

表 10

可溶性組織因子に加える上昇していく濃度のVII a 因子によるX a 因子発色活性の刺激。光学密度の変化は発色原基質S-2222を用いた測定。

VII a 因子の濃度 (nM)	OD <sub>405</sub>
.78	.168
1.56	.288
3.12	.478
6.25	.694
12.50	.764
25.00	.790
50.00	.738
100.00	.770

表 11

天然 VII a 因子の存在下での可溶性組織因子に対する DEGR-VII a 因子の添加による X a 因子発色活性の阻害を測定。光学密度の変化は発色原基質 S-2222 を用いて測定。

DEGR-VII a 因子の濃度 (nM)	OD <sub>405</sub>
0	0.810
50	0.750
100	0.609
200	0.296
400	0.167
800	0.083
1600	0.055

#### 実施例 X

##### DEGR-VII a 因子による凝固の阻害

凝塊時間に及ぼす DEGR-VII a 因子の効果をモニターする標準凝塊アッセイを下記の通りに準備した：

抗凝固剤としてのクエン酸ナトリウムにより集めた 100  $\mu$ l の正常ヒト血漿を TBS (20mM のトリス、pH7.4 : 150mM の NaCl) に希釈してある様々な濃度の DEGR-VII a 因子 100  $\mu$ l に加えた。このサンプルを混合し、そして 37°C で簡単にインキュベートした。このサンプルを Electra 800 自動 Coagulation Timer (Medical Laboratories Automation, Pleasantville, NY) に加えた。インキュベーション後、25mM の CaCl<sub>2</sub> を含む 200  $\mu$ l 組織因子調製品を DEGR-VII a 因子調製に加えた。組織因子調製品は新鮮な凍結脳組織由来のヒト脳の食塩水抽出物として作り、そしてヒト血漿における凝固を開始する能力について特性化した。約 40 秒の凝塊時間を付与する組織因子の濃度を選んだ。

表 12 に示すデータは、DEGR-VII a 因子の添加に基づく凝塊時間の投与量依存性増大を示す。血漿中の 1  $\mu$ g/ml ほど低い DEGR-VII a 因子の投与量が凝塊時間の有意な増大をもたらした。

表 12

Factor VII a .

DEGR-VII a 因子に基づく凝塊時間の投与量依存性増大。

DEGR-VII a 因子 ( $\mu$ g/ml血漿)	凝塊時間 (秒)
0	40.7
0.5	46.2
1.0	50.8
2.5	64.5
5.0	108.1
10.0	158.4

実施例 X IDEGR-VII a 因子による血小板蓄積の阻害

DEGR-VII a 因子を、非ヒト霊長類における機械的傷害に基づく動脈血栓部位での血小板蓄積を阻害する能力について分析した。動脈血管内膜切除術のモデルを本質的にLumsden ら (Blood 81: 1762-1770, 1993) に記載の通りにしてヒヒにおいて利用した。長さ1~2cmのヒヒの動脈区域を取り出し、ひっくり返し、そして動脈の内膜及び約50%の媒質を取り除くためにひっかいた。その動脈をその正しい向きに戻し、両端にカヌーレを施し、そしてヒヒの体外シャントに設置し、これによりその機械的に傷害を受けた動脈をそのシャントを介してヒヒの血液にさらされるようにした。シャントを循環血液に通じさせる直前に、 $^{111}\text{In}$ -ラベル化自己血小板をその動物に静脈内注射した。傷害を受けた動脈部位での血小板の蓄積レベルをリアルタイム・ガンマーカメライメージングにより決定した。

血小板蓄積の阻害についてのDEGR-VII a 因子の評価はDEGR-VII a 因子又は食塩水コントロールのボーラス注射を利用して行い、そしてシャントを通じさせる直前に与えた。傷害を受けた動脈を60分間連続測定した。0.005mg/kgのDEGR-VII a 因子投与量が血小板蓄積を阻害した。1.0mg/kgのボーラス注射では、約90%の血小板蓄積が薬剤投与の1時間後において阻害された。

これらのデータは、DEGR-VIIa 因子による組織因子の阻害が、急性血管傷害の非ヒト霊長類モデルにおける血小板に富む血栓の発症を有意に阻害することを示す。

#### 実施例 XII

DEGR-F VIIa はバルーン血管形成術を経たアテローム症のウサギの血管再狭窄を阻害する

DEGR-F VIIa を、バルーン血管形成術を経たニュージーランドホ

ワイト (NZW) アテローム症ウサギにおける損傷発症を軽減するその能力について評価した。この動物モデルはよく特性決定されており、そして血管損傷発症に対する抗血栓性化合物の評価のための良好なモデルであることが実証されている (Gimple ら, Circulation 86 : 1536-1546 (1992) 及び Rogosta ら, Circulation 89 : 1262-1271 (1994))。DEGR-F VIIa を評価するために用いる動物モデルは本質的に Rogosta 前掲に述べられている。

ウサギを筋肉内注射により 5 mg/kg のキシラジン及び 35 mg/kg のケタミンで麻酔した。近位大腿動脈を近位及び末梢結紮して鼠径靱帯を下を切ることにより曝露させた。取り出したセグメントに 27 ゲージ針をカヌーレ挿入した。針穿刺により穴を開けた。取り出したセグメントに食塩水をフラッシングして残留血液を除去し、そしてエアーを 80 ml/min の速度で 8 分注入することにより乾燥させた。エアー乾燥後、取り出したセグメントに再度食塩水をフラッシングし、そして結紮糸を除去した。非閉塞性局部加圧により止血を維持した。このセグメントを金属クリップで分界した。局部痙攣は 1 % のキシロカインで局部処置した。手術の後、動物をバルーン血管形成術まで 1 ヶ月にあたり 1 % のコレステロール及び 6 % のピーナッツオイル食に付した。術後の痛みの緩和のためにタイレノールを 10 mg/kg で経口付与した。術後 3 ~ 5 日目にはアンビペンを 1 cc 与えた。

動物に対する試験薬導入は、バルーン血管形成術直前の初期ボラス注射、それに次ぐ内頸静脈を介する浸透ポンプによる連続全身点滴より成る。薬剤点滴期間は 3 日とした。コントロール動物には、バルーン血管形成術の前に 150 U/kg IV ボラスのヘパリンを与え、次いで食塩水点滴した。DEGR-F VIIa 処置し

た動物には1 mg/kgのボーラス注射、次いで50  $\mu$ g/kg/hrの点滴を与えた。

連続全身点滴のための浸透ポンプの設置のため、動物を上記の通りに麻酔し、そしてその処置の間ケタミン及びキシラジンの追加のIM注射を維持しておいた。中線頸部切開を介して、右内頸静脈をブラント切開により取り出し、そして末端を結紮した。右内頸静脈にシラスチックチューブ(PE-160)を導入した。シラスチックチューブを返すために皮下トンネルを設けた。このチューブを浸透ポンプに接続した。この浸透ポンプをウサギの背中に皮下移植した。右共通頸動脈をブラント切開により取り出し、そして末端を結紮した。動脈切開術を介して、5 F 導入器を設置し、そして大動脈弓の接合部にまで進めた。止血パラメーター、薬剤及びコレステロールレベルの決定のために採血した。20mgのキシロカインを動脈内注射した。コントロールの腸骨・大腿大動脈血管撮映を、手により3秒間にわたり注射する3~4 mlのノレグラフィンを利用して大動脈分岐の上に配置した5 F Berman カテーテルを介して行った。

Bermanカテーテルの除去の後、0.014 インチのガイドワイヤーを下向性大動脈に導入し、そして大動脈分岐の上方に配置した。フルオロスコープガイドもので、2.0~2.5mm の適当なサイズのバルーン血管形成カテーテルを導入し、そしてガイドワイヤーを超えて狭窄にわたって配置した。バルーンを手動インフレーターにより6大気圧に60秒間ふくらました。3回のふくらましを、ふくらましの間60秒の間隔をおいて実施した。この処置を各動物における双方の大腿動脈に施した。

バルーン拡張の後、血管形成カテーテルを抜き取り、そしてBermanカテーテルを大動脈分岐の3 cm上の位置に再導入した。痙攣を最小限にするため、20 gのリドカインを動脈内付与した。大腿動脈のレベルに1 cmのグリッドを配置し、実際の直径を計算した。次いでカテーテルを取り除いた。右頸動脈を3-0 絹により層状で巻状縫

合することにより結紮した。アンビペン及びアセタミノフェンを上記の通りに与えた。

血液中でのDEGR-F VIIaのプロトロンビン時間及び濃度を試験化合物のボラス注射の直前、ボラス注射の1 hr後、及び連続点滴の終了3日後に決定した。1～2 mlのクエン酸処理血漿を獲得し、そしてプロトロンビン時間及び抗原レベルを決定した。

コントロール及びDEGR-F VIIa処置動物におけるプロトロンビン時間をモニターするために以下の通りの標準凝塊アッセイを利用した。抗凝血剤としてのクエン酸ナトリウムと一緒に集めた25  $\mu$  lの試験ウサギ血漿を150  $\mu$  lのTBS (20 mMのトリス、pH7.4, 150 mMのNaCl)に加えた。このサンプルを混合し、そしてElectra 800 自動凝塊タイマー (Medical Laboratories Automation, Pleasantville, NY)に入れた。インキュベーション後、25 mMのCaCl<sub>2</sub>を含む200  $\mu$  lのトロンボプラスチン調製品 (Sigma Chemical) を血漿調製品に加えた。コントロールのウサギ血漿において約20秒の凝塊時間をもたらすトロンボプラスチン濃度を選定した。

コントロール及びDEGR-F VIIa処置したウサギ由来の血漿サンプル中のDEGR-F VIIaの濃度を決定するためにELISAアッセイを利用した。このアッセイは抗ヒトF VIIモノクローナル抗体 (New Mexico大学のDr. W. Kisiel)の0.1 Mの炭酸バッファー pH9.6への2.0  $\mu$  g/mlに至る第1希釈、及び96穴プレートへの100  $\mu$  l/ウェルでの添加を含む。次いでプレートを4℃で一夜インキュベートし、次いで洗浄バッファー (PBS, pH7.4, 0.05%のTween 20含有)を利用して2回洗浄した。非特異的結合部位のブロッキングはウェル当たり200  $\mu$  lのブロッキングバッファー (PBS, pH7.4, 0.05%のTween 20及び1%のBSA含有)との37℃で2 hrにわたるインキュベーション、それに続く洗浄バッファーを利用する洗浄により成し遂げた。

。

ブロッキング後、20～0.027 ng/mlに範囲するDEGR-F VIIaの標準希釈系列を、100  $\mu$  l/ウェルで適用した試験ウサギ血漿の希釈系列 (ブロッキングバッファー中で1:100～1:4000)と一緒に加えた。ネガティブコントロールとして非免疫ウサギ血漿を用いた。次いでプレートを37℃で1 hインキュベーション

し、そして洗浄バッファーで4回洗浄した。

DEGR-F VII a はブロッキングバッファー中の1:1,000希釈率のウサギ抗ヒトF VIIポリクローナル抗体(New Mexico大学のDr. Kisiel)の100 $\mu$ l/ウェルでの添加により検出した。プレートを37℃で1hインキュベーションし、次いで洗浄バッファーで5回洗浄した。特異的な抗体結合は1:2,000希釈率のヤギ抗-ウサギIgG抗体-ペルオキシダーゼコンジュゲート(Tago, Inc.)100 $\mu$ l/ウェルを用いて検出した。プレートを37℃で1hインキュベーションし、そして洗浄バッファーで6回洗浄した。最後に、100 $\mu$ lの基質溶液(0.2Mのクエン酸バッファー pH5.0中の0.42mg/mlのO-フェニレンジアミン二塩酸塩〔OPD〕、0.3%のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含有)を加えた。室温で1~3分後、発色反応を100 $\mu$ l/ウェルの1NのH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えることにより停止させ、次いでプレートをマイクロプレート光度計で490nmにおいて読み取った。血漿サンプル中のDEGR-F VII a の濃度は、未知のもののA<sub>490</sub>値をDEGR-F VII a 標準曲線のそれと対比させることにより決定した。

プロトロンビン時間及びDEGR-F VII a 抗原レベルについての血漿サンプルの分析を表13及び14のそれぞれに示す。データは個別の動物について示す。表15は平均凝塊時間のまとめを示す。全てのケースにおいて、DEGR-F VII a 処置した動物はボーラス注射1時間後の時点で高いプロトロンビン時間を有し、これは3日目においては

ば処置前のレベルにもどった。DEGR-F VII a 抗原レベルの分析は1hrの時間において高い血漿中のDEGR-F VII a レベルを示し、血漿中で2~6 $\mu$ g/mlに範囲し、3日目でははるかに低い循環レベルとなった。1hr目で測定したDEGR-F VII a のレベルはプロトロンビン時間の推定上昇と一致し、それは正常ウサギ血漿をDEGR-F VII a でin vitroでスパイキングし、そして標準希釈トロンボプラスチンアッセイにおいてプロトロンビン時間を測定することにより測定した。



表 13 プロトンビン時間の測定				
		凝塊時間 (秒)		
動物番号	処 置	予備処置	1 時間	3 日
73	コントロール	24.8	22.3	17.8
74	コントロール	24.8	27.9	18.6
75	コントロール	24.6	N/D	20.5
76	コントロール	22	N/D	17.9
169	コントロール	21.2	22.9	22
170	コントロール	24.9	23.5	18.6
173	コントロール	25.9	21	20.8
174	コントロール	25	29.4	20.1
77	DEGR-F VII a	22.5	40.1	18.3
78	DEGR-F VII a	24.3	34	20.9
80	DEGR-F VII a	24.7	50	21.7
96	DEGR-F VII a	N/A	N/A	21
97	DEGR-F VII a	23.6	33.3	21.2
171	DEGR-F VII a	20.6	45.8	21.9
172	DEGR-F VII a	23.5	41.6	22.4

N/A = データーは得られず

表 14				
ウサギ血漿中のDEGR-F VII aを検出するためのELISA				
		F VII a ELISA (ng/ml)		
動物番号	処 置	予備処置	1 時間	3 日
73	コントロール	0	13	0
74	コントロール	36	14	4
75	コントロール	0	N/A	9
76	コントロール	0	N/A	14
169	コントロール	0	0	1
170	コントロール	0	0	0
173	コントロール	36	31	0
174	コントロール	87	86	160
77	DEGR-F VII a	0	3,210	102
78	DEGR-F VII a	1	4,950	7
80	DEGR-F VII a	13	4,543	661
96	DEGR-F VII a	65	4,900	117
97	DEGR-F VII a	4	4,600	502
171	DEGR-F VII a	13	2,145	212
172	DEGR-F VII a	9	2,830	228

N/A = データーは得られず

表15. 血漿凝塊時間の統計学的まとめ

不対合 t - 検定 X			出血前	
DF :		不対合 t 値	確率 (2-テール):	
12		1.12	.2852	
グループ :	数 :	平均 :	標準偏差	標準誤差
コントロール	8	24.15	1.64	.58
DEGR-VII a	6	23.2	1.48	.6

不対合 t - 検定 X			ANGIO 1hr 後	
DF :		不対合 t 値	確率 (2-テール):	
10		-5.44	.0003	
グループ :	数 :	平均 :	標準偏差	標準誤差
コントロール	6	24.5	3.35	1.37
DEGR-VII a	6	40.8	6.53	2.67

<u>不対合 t ー検定</u> X		<u>ANGIO 3 日後</u>		
DF :		確率 (2-テール):		
13		.0622		
不対合 t 値 :				
-2.04				
<u>グループ</u> :	<u>数</u>	<u>平均</u>	<u>標準偏差</u>	<u>標準誤差</u>
コントロール	8	19.54	1.53	.54
DEGR-VII a	7	21.06	1.33	.5

血管形成術の3週間後、犠牲にする直前に左頸動脈を介して上記の通りにフォローアップ血管撮映を繰り返した。垂直下方腹部切開を介し、遠位大動脈を取り出し、その近位をくくり、そしてパーフュージョンカヌーレを大動脈分岐の上に挿入した。遠位大動脈に50

mlの食塩水をフラッシュし、次いで500mlのHistochoice (AMRESCO, Solon, Oh) 溶液を120mmHgで15分注入することで in vivo固定した。パーフュージョンを開始したら、動物を過剰用量のネムブタール (3mlのナトリウムペンタバルビター

ルIV, 65mg/ml) で犠牲にした。5 cmの大腿動脈セグメントを左右から切り出した。この組織を光学顕微鏡観察のためにHistochoice 溶液の中に保存した。

バルーン血管形成部位での内膜損傷発生を調べるため、切除した大腿動脈を3 mmのセクションに切り、パラフィンの中に包埋し、そして各動脈について多数の領域から切片を切り出した。この切片をガラススライドの上に載せ、そしてそのスライドをヘマトキシリン及びエオシン、並びにVan Gieson 染色液で染色した。形態分析をBioquant Programにより実施し、管腔、内膜及び中膜の面積を得た。負傷した動脈由来の組織セクションの形態分析は、全管腔面積；内部弾性層内の面積を測定し、それから各組織区分由来の対応の管腔面積を差し引くことにより決定した内膜の面積；及び外部弾性層の内側の面積を測定し、それから内部弾性層の内側の面積を差し引くことにより決定した中膜の面積を測定して行った。コントロール及びDEGR-F VII a 処置した動物における大腿動脈の内膜損傷についての測定は、DEGR-F VII a 処置した動物における内膜のサイズの有意な減少を示した(表16)。反対に、中膜領域の測定は2つの群の間での有意な差を示さなかった。

表16. バルーン血管形成処置したウサギにおける 内膜及び中膜の測定				
グループ	N	内膜 (mm <sup>2</sup> )	標準偏差	確率 (2-テール)
コントロール	13	0.819	0.414	0.0138
DEGR-F VII a	10	0.438	0.192	
グループ	N	中膜 (mm <sup>2</sup> )	標準偏差	確率 (2-テール)
コントロール	13	0.389	0.098	0.172
DEGR-F VII a	10	0.329	0.105	

血管撮映測定由来のデーターを表17に、コントロール及びDEGR-F VII a 処置した動物の血管形成術直前、血管形成術直後及び血管形成術の21日後の3つの時点全てについての平均管腔直径(MLD)±標準偏差として紹介する。血管形成術直

前及び直後のいずれにおいても、コントロール動物とDEGR-VIIa処置動物との間でMLDの有意な差はなかった。しかしながら、DEGR-FVIIa処置した動物においては血管形成術の21日後の測定においてMLDの有意な上昇が認められた。

表17. 最小管腔直径の測定 (MLD)				
MLD の - PTCA前測定				
グループ	N	平均 MLD	標準偏差	確率 (2-テール)
コントロール	13	1.202	0.24	0.3883
DEGR-F VII a	10	1.283	0.19	
MLD の - PTCA後測定				
グループ	N	平均 MLD	標準偏差	確率 (2-テール)
コントロール	13	1.492	0.551	0.5326
DEGR-F VII a	10	1.323	0.725	
MLD の21日後測定				
グループ	N	平均 MLD	標準偏差	確率 (2-テール)
コントロール	13	0.889	0.228	0.0001
DEGR-F VII a	10	1.393	0.242	

#### 実施例 XIII

##### DEGR-FVIIaによるヒトのSMC 上での細胞表層Xa因子の発生の抑制

細胞表層組織因子に対するFVIIa結合を阻害する、及びそれに引き続くヒトの平滑筋細胞(SMC)の単層上でのX因子からXa因子に至る変換を阻害するDEGR-FVIIaの効能を測定するために細胞表層発色アッセイを本質的に上記の実施例VIIIに記載の通りに開発した。この方法はSakai ら, J. Biol. Chem. 264: 9980-9988 (1989) 及びWildgooseら Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87 : 7290-7294 (1990) に記載の方法の改良である。ヒトのSMC はワシントン大学Seattle, WA より入手し、そして大動脈外植から培養した。ヒトのSMC を96穴培養皿の中で、10%の胎児牛血清の添加された 200 $\mu$ l / ウェルのDMEM培地の中で 8,000 細胞 / ウェルの濃度でプレート培養

し、そして5%のCO<sub>2</sub>の中で37℃で4日間この培地の中に維持した。アッセイ時、110 $\mu$ lの培養培地を除去し、そして上昇していく濃度のF VII a又はDEGR-F VII aの組合せとなったF VII aをウェルに加えた。5 nMから0.04nMに範囲するF VII a濃度の標準曲線を作った。F VII a活性に対するDEGR-F VII aの阻害活性を測定するため、上昇していく濃度のDEGR-F VII aを一定量のF VII a (5 nM)の存在下で試験ウェルに加えた。F VII a及びDEGR-F VII aの双方をHEPES バッファー(10nMのHEPES, 137mMのNaCl, 4 mMのKCl, 5 mMのCaCl<sub>2</sub>, 11mMのグルコース、0.1%のBSA)で希釈し、そして10 $\mu$ lの10 $\times$ ストック溶液を細胞に加えた。この細胞を試験化合物と37℃で2 h インキュベーションし、次いでHEPES バッファーで3回洗った。トリスバッファー(25mMのトリス、pH7.4, 150mMのNaCl, 2.7 mMのKCl, 5 mMのCaCl<sub>2</sub>, 0.1%のBSA)中の200nMのX因子溶液50 $\mu$ lを各ウェルに加えた。室温で4分後、25 $\mu$ lの0.5MのEDTAを加えてX因子からX a因子に至る変換を停止させた。ウェル当たりトリスバッファー中の25 $\mu$ lの0.8mMのS-2222、即ちX a因子特異的発色基質を加え、そして405nmでの吸収を60分後にThermomax マイクロプレートリーダー(Molecular Devices Corp., Menlo Park, CA)で測定した。

図3に示す結果は、F VII a処理ウェル(白四角)についての用量依存性アミド分解活性の上昇を示す。吸収の上昇はウェルの中で生じたX a因子のレベル及び発色基質のその後の分解の直接的な尺度である。添加するDEGR-F VII aの量を増やし、F VII aの量を一定にすると(5 nM)、DEGR-F VII aのレベルの上昇に伴いアミド分解活性の用量依存性低下が示された(黒四角)。DEGR-F VII a、対、F VII aの等モル比は発色活性を>90%阻害できた。10分の1のレベルのDEGR-F VII aでさえも、X a因子発色活性の発生の40%阻害があ

った。これらの結果は、DEGR-F VII aが、SMCの無傷な細胞単層の表層に対するF VII aによるX因子からX a因子に至る活性化の非常に有能な拮抗因子である所見を裏付けする。

#### 実施例XIV

##### ヒトの血管血栓形成及び血管損傷形成に対するDEGR-VII a 因子の効果

ヒトDEGR-VIIa因子を、非ヒト霊長類における機械的血管損傷により誘導される血管損傷形成(VLF)の組織因子(TF)及び活性化VII因子(FVIIa)媒介を阻害する能力について試験した。

ヒトにおいて機械的血管損傷を作り上げる直前から始めて、DEGR-VIIa因子を7日間(5匹の動物)又は30日間(1匹の動物)静脈内点滴した。30日目に血管損傷形成についての測定を行った。5匹の処置動物の結果を、同時進行させた5匹のビヒクルバッファ点滴コントロールにおける結果と比較した。

以下についての基底測定値を試験動物について得た；a)血小板数、好中球数、単球数及び赤血球数；b)血漿フィブリノーゲンレベル；c)抗原レベルのFVIIとのVII, VIIa, X及びV血漿凝固因子の活性レベル；並びにd)抗VIIa因子抗体についての基底血漿サンプルレベル。

ハロタン麻酔及び無菌作業条件下で、自系<sup>111</sup>In-血小板でラベルした動物に、連続静脈内投与のためのテザー(tether)系を用いてDEGR-FVIIaの静脈点滴を与えた(最初は1mg/kgのボラス注射、続いて50μg/kg/hrの連続静脈内点滴)。動物を外科的頸動脈血管内膜切除術、左右上腕動脈又は左右大腿動脈Fogartyバルーンカテーテル血管形成術にかけた。

DEGR-FVIIaをテザー系を用い、静脈内カテーテルを介する連続点滴により7又は30日間投与した。手術の30日後、動物をハロタン

で麻酔し、そして0.1%のグルタルアルデヒドを含む4%のパラホルムアルデヒドで30分 in situ加圧パーフュージョン固定にかけた。その際、血管セグメント(予め損傷した部位を含む)をHarkerら Circulation 83:41-44 (1991) 及びHansonら Hypertension 18 : 1170-1176 (1991) の手順を利用して回収した。検体をin vitroで後固定し(0.1%のグルタルアルデヒドを含む4%のパラホルムアルデヒド)、低温保存し、そして損傷程度の形態分析を行った。

11匹の正常な成熟ヒト(Pan anubis)を試験した。6匹の動物にDEGR-FVIIa点滴(50μg/kg/hr)を与え、そして残りの5匹はDEGR-FVIIaを与えないコントロール動物とした。動物を寄生虫駆除にかけ、そして利用するまで3ヶ月にわたり病気がないものと観察された。手順は全てInstitutional Animal Care

and Use Commiteecにより認定され、そしてCare and Use of Laboratory Animals 及びAnimal Welfare Act及び関連の機関により指針された手順及び方法に合致する。侵入性手順はケタミン(10mg/kg筋肉内)及びバリウム(0.5mg/kg静脈内)により誘導した後のハロタン麻酔のもとで実施した。術後の実験手順の実施におけるその後の短時間固定のため、ケタミン塩酸塩(5~20mg/kg: 筋肉内)を利用した。

頸動脈血管内膜切除術を、引用することで本明細書に組入れるHansonら Hypertension 18 : 1170-1176 (1991) 及びKrupski ら、Circulation 84 : 1749-1757 (1991) の技術を利用する中線頸部切開を介して実施した。動脈血管内膜切除術を血管損傷モデルとして利用した。その理由はその臨床的適正、及び正常な動脈の血管内膜切除術により誘導されるVLF が再現性を有することにある。簡単に述べると、共通頸動脈の近位鎖骨から遠位頸部分岐にかけての周囲組織を切除した。共通頸動脈を硫酸ヘパリンのボラス注射(静脈内で 100U/kg; Elkins-Simm Inc., Cherry Hill, NJ)の3分後に露

出脈管の各端に配置した外傷性血管クランプを用い交差クランプし、そして遠位交差クランプの1cm近傍で分割した。近位動脈セグメントを湾曲したメスの上にめくり返した。最大のめくりとなったら、管腔露出セグメントにおいて、一对のポリプロピレン支持縫合糸(7-0)をいずれかの側に近傍的に、そして第二対を遠位的に配置した。次に動脈内膜切除術をめくり返した血管セグメントの分割した先端から1cmの箇所を始め、そして1cmの測定距離にわたって続けた。この手順は、メス及び外科用顕微鏡(倍率32倍)を利用する、正常な内膜及び中膜の部分的な厚みの機械的除去含む。動脈内膜切除術の後、血管をその正常な形態にもどし、そして7-0ポリプロピレン縫合糸及び2.5の倍率での連続技術並びに層状での巻状閉鎖により先端吻合を実施した。

VLF の形態分析のため、セクションをパラフィンに包埋し、そして接続組織成分(コラーゲン、エラスチン)について染色し、そしてヘマトキシリン-エオシンにより、高解像(700ライン)モニターに装着された高解像(580ライン)CCD マイクロスコープカメラ、IBM 386 チップ、イメージ獲得及び保存のための高解像グ



ラフィックデシタブルの装着された80MBコンピューターより成るイメージ分析系 (Thomas Optical Measurement Systems, Columbus, GA) の付いたZeiss フォトスコープを用いて評価した。定量イメージ分析は形態ソフトウェアドライバ (Optimas, Bioscan, Inc., Edmonds, WA) を利用して実施した。動脈横断面は新生内膜増殖損傷と対応の動脈中膜領域の総面積に関連して分析した。統計学的分析のため、グループ間の対比を対合及び不對合データに関してStudent t 検定 (2テール) を利用して行った。

結果は、内膜面積が、7日間にわたりDEGR-VIIa 因子により処置し、そして30日目に試験した動物において、同じ血管損傷を有する

がDEGR-VIIa 因子を全く獲得していないコントロール動物と比べて有意に縮小されたことを示した (図4)。類似の結果が30日間DEGR-VIIa 因子で処置し、そして30日目に調べた動物において見いだされた。

バルーン血管撮映した上腕動脈モデルによる予備試験は、DEGR-VIIa 因子療法の有意な長所を示唆しなかった。しかしながら、このモデルは、組織因子が重要な役割を担っている血栓形成前のモデルであるヒヒで実証されていない。

ヒヒでの大腿動脈バルーン損傷による試験は、図5に示す通り、コントロールと比べてDEGR-VIIa 因子に由来する統計学的に有意な長所を示した。

#### 実施例 XV

##### tPA 誘導型血栓溶解に対する DEGR-VIIa 因子の効果

急性心筋梗塞の際の進行中の冠状血栓形成は主として外生凝塊経路を通じてVIIa 因子と複合した組織因子 (TF) により媒介される。組織プラスミノゲンアクチベーター (TPA) 血栓溶解の効率に及ぼす内因性経路における様々な時点での付随的な凝固カスケードの効果を決定した。

tPA による血栓溶解 (20分にわたり 1 mg/kg) にかけている電気誘導式冠状血栓を有する36匹のイヌに4通りの付随処置の1つを付与した: 9匹に選択的Xa 因子インヒビターであるチック抗凝固ペプチド (TAP) を 30  $\mu$ g/kg/min で90分与えた。TF-VIIa 因子複合体を9匹のイヌにおいて組換え組織因子経路インヒビター (TFPI) (100~150  $\mu$ g/kg/min で90分) により阻害し、そして9匹のイ

ヌにおいて活性化VIIa因子の競合拮抗因子としてのDEGR-VIIa (1~2 mg/kgのボラス)により阻害した。9匹のイヌに食塩水コントロールを与えた。イヌを血栓溶解後120分にわたって再閉塞につい

て観察した。血栓溶解に及ぼす効率性に対するこれらの因子の効果を以下の表18に示す(データは平均±SDとして表示)。

表 18.

	食塩水	DEGR VII a	TFPI	TAP
再流までの時間 (min)	32±13	20±7 *	21±6 *	18±10 *
再流時間 (min)	62±45	70±48	91±35 *	120
循環流変動	70%	89%	56%	0%
再閉塞	70%	78%	67%	0%

\* 有意差0.05の $\alpha$ レベルでの食塩水コントロールから値の差

これらのデータは、DEGR-VIIa又はTFPIによるXa因子又はTF-VIIa因子遮断のいずれかを介する外因性経路阻害が tPA-誘導式血栓溶解を加速することを示唆した。Xa因子の選択阻害は有効な再灌流を経て動脈通気性をより効率的に維持した。

#### 実施例 XVI

##### 全身系凝塊に影響することなく血管内血栓形成を阻害する改良型VIIa因子

TFに対するVII因子の結合の阻害が抗血栓効果をもたらすかどうかを調べるため、再発血栓形成に基づく循環流変動(CFV)を内皮損傷ウサギ頸動脈(Fottsモデル)のまわりに外部圧迫器を設置することにより開始させた。頸部血流を圧迫器の近くにドップラーフロープローブを配置することにより連続的に測定した。圧迫器を動脈のまわりに配置した後、6羽のウサギのうちの6羽においては平均11±2サイクル/hrの周波でCFVが発生し、一方頸部血流速はCFVの底期において平均5±2%の基底値であった。CFVを30分観察後、動物にヒト組換え活性部位ブロックされた(Phe-Phe-Arg-クロロメチルケトン)VIIa因子(FVIIai)(0.1 mg/kg/minで10分)の点滴を付与した。VIIai因子は6羽の動物のうちの6羽においてCFVを完全

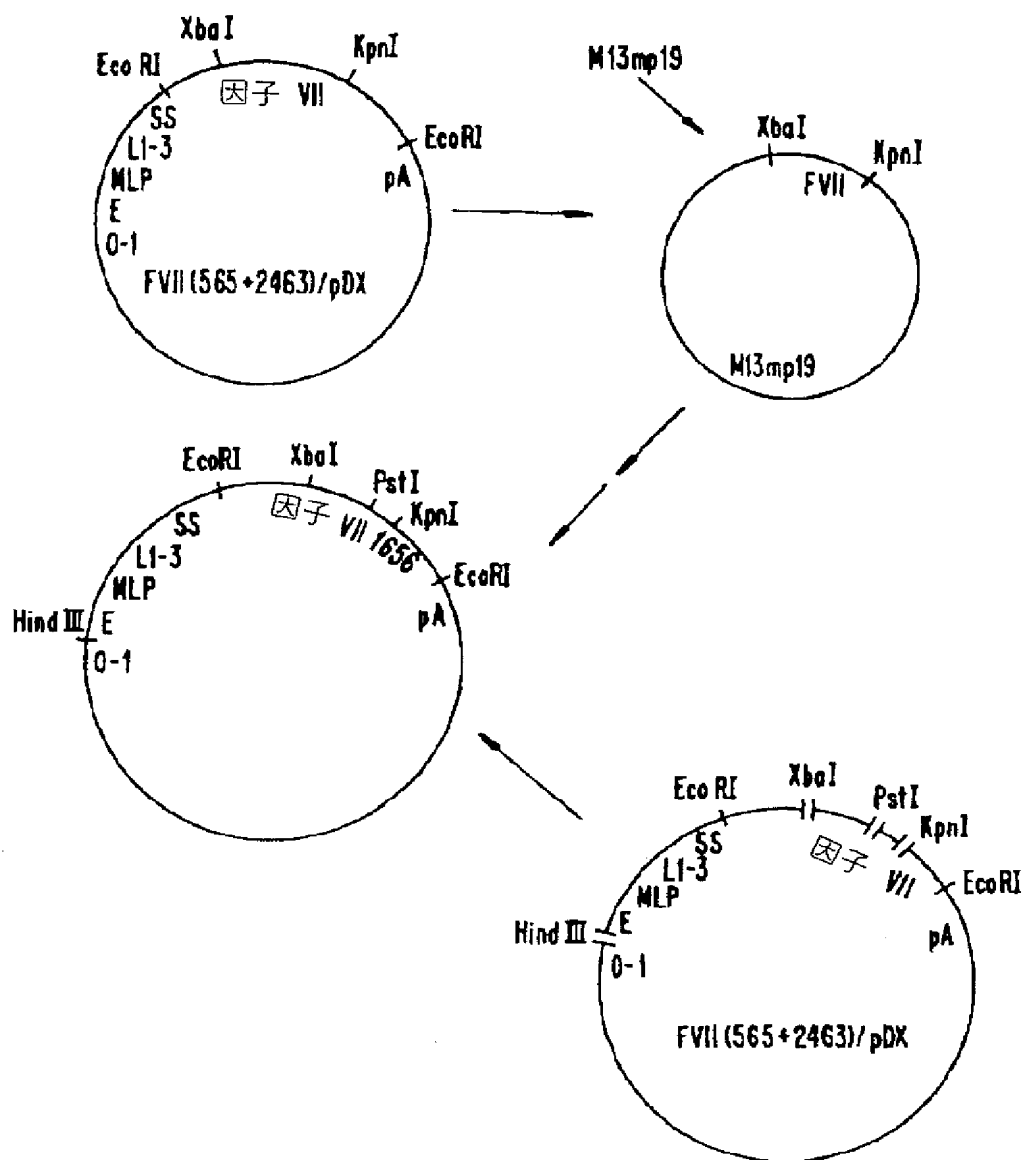
に消失させた(CFV周波 = 0 サイクル/hr ;  $p < 0.05$  ; 頸部血流速 = 基底値の 106.9% ;  $p = \text{NS vs. 基底値}$ )。CFV の阻害の30分後、ヒト組換 F VII a を10分にあたり 0.1mg/kg/min の用量で点滴した。VII a 因子の点滴は全ての動物においてCFV を復帰させ、それ故TFに対するVII a 因子の結合が競合的であることを示唆する。プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間、並びにADP 及びトロンビンに応答する *ex vivo*血小板凝集は基底値と比較して、F VII ai点滴を経ても相違がなかった。即ち、F VII - VII a は *in vivo*での血栓形成の開始において重要な役割を果たす。VII ai因子の投与は全身凝固に影響することなくこのモデルにおいて有能な抗血栓作用を及ぼした。

以上より、改質された触媒部位を有し、組織因子に結合し、しかもX及びIX因子を実質的に活性化できないVII因子又はVII a 因子の組成物が提供されることが明らかである。改良型VII因子は凝塊因子を分解又は消費することなく凝塊カスケードを妨害できるため、改良型VII因子調製品の投与は現状の療法で経験するよりも少ない望ましくない副作用が伴うであろう。更に、本明細書に記載のこの改良型VII因子は組換手段により簡単に作られうる。その薬効、慣用さ、並びに低投与量及び少ない投与頻度の経済性、更には毒性の相対的欠如が本発明の組成物により供される利点である。

以上で本発明を例示の目的でかなり詳しく説明してきたが、本発明はその範囲を逸脱すること変更及び改良されうる。

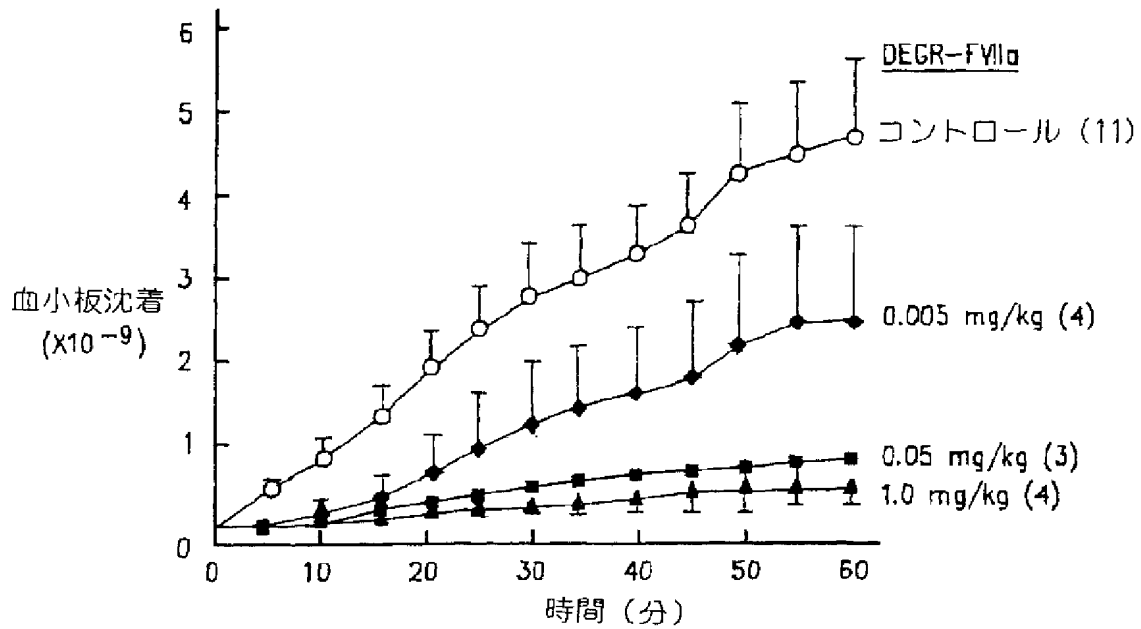
【 図 1 】

Fig. 1



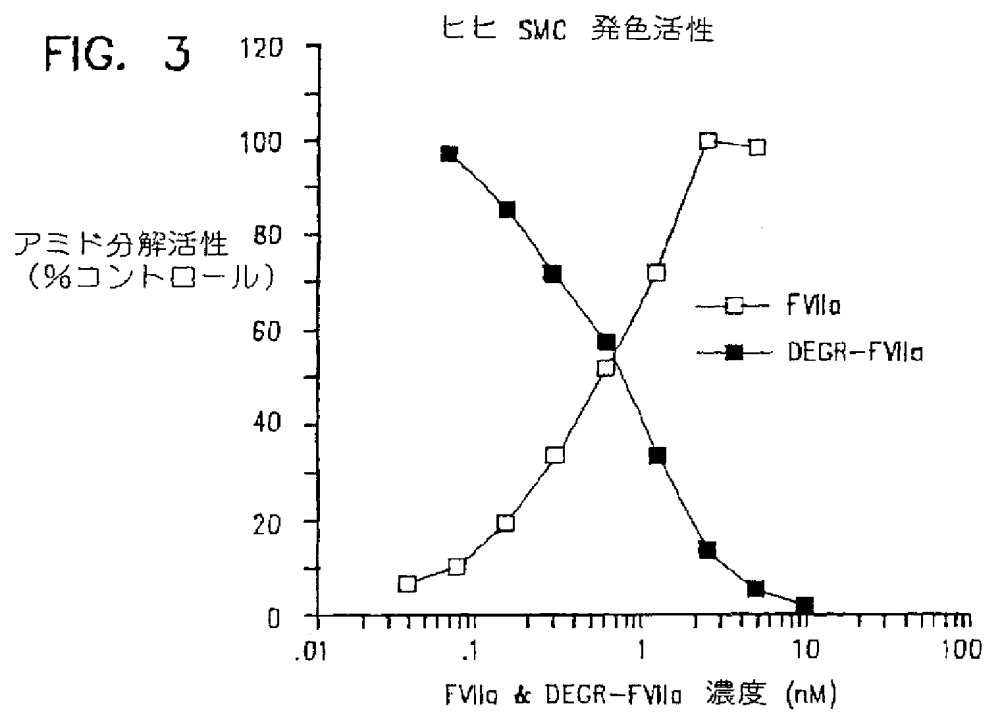
【図2】

FIG. 2



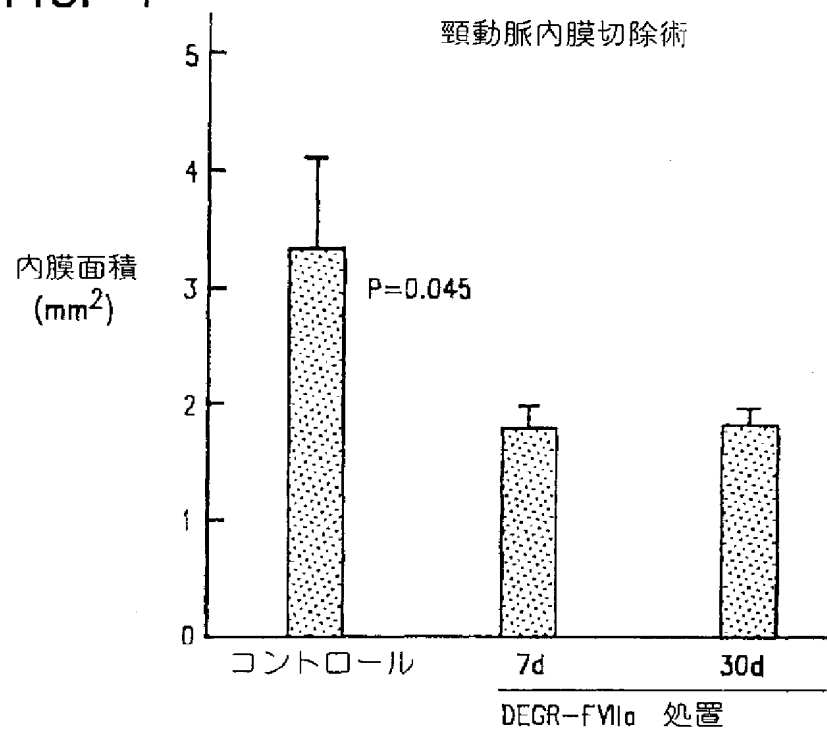
【図3】

FIG. 3



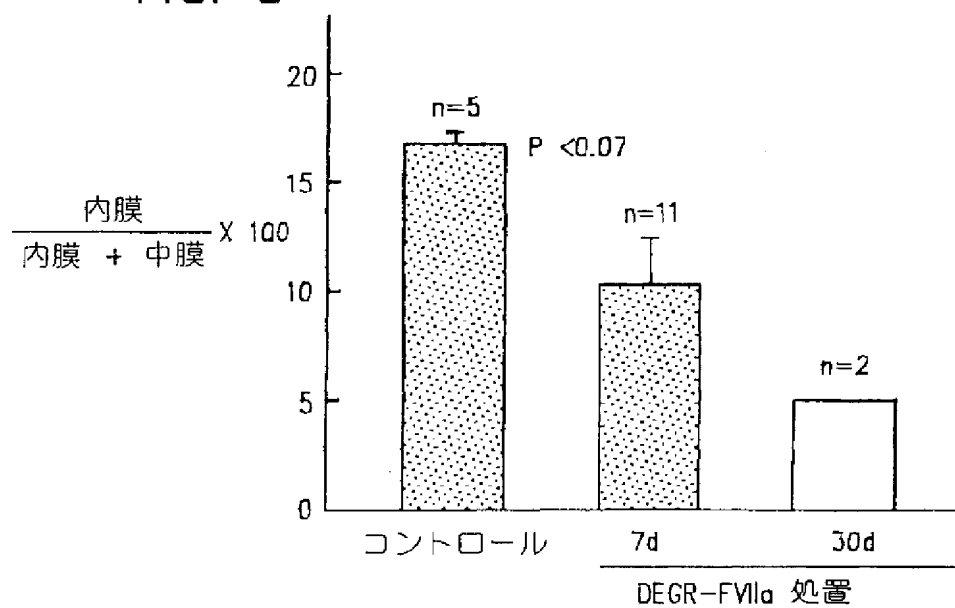
【図4】

FIG. 4



【図5】

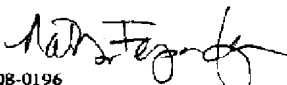
FIG. 5



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US95/13925

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(6) : C12N 9/48, 9/50, 9/64; A61K 38/46, 38/48 US CL : 435/212, 219, 226; 424/94.63, 94.64 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/172.3, 212, 219, 226; 424/94.63, 94.64 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE search terms: factor VII, active site, modify, mutate, anticoagulant		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Biochemistry, Volume 25, issued 1986, Y. Nemerson, "An ordered addition, essential activation model of the tissue factor pathway of coagulation: Evidence for a conformational cage", pages 4020-4033, see abstract.	1-23
Y	US, A, 4,829,052 (GLOVER ET AL) 09 May 1989, abstract, claims.	1-23
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
03 JANUARY 1996		19 JAN 1996
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231		Authorized officer
Facsimile No. (703) 305-3230		DIAN C. JACOBSON 
		Telephone No. (703) 308-0196

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	A

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, JP, KE, KG, KP, KR, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SI, SK, TJ, TT, UA, UZ, VN

(72)発明者 バークナー, カスリーン, エル.  
アメリカ合衆国, オハイオ 44106, クリーブランド ハイツイ, チャットフィールド 2194

(72)発明者 ビーターセン, ラルス, クリスチャン  
デンマーク国, デーコーホルムソルム, ハベバイ 4

(72)発明者 ハート, チャールズ, イー.  
アメリカ合衆国, ワシントン 98036, ブリエール, トゥエンティーファースト アベニュー ウェスト 21502

(72)発明者 ヘドナー, ウラ  
スウェーデン国, エス-21 618 マルモー, カリタスガートン 19

(72)発明者 ブレゲンガルド, クラウス.  
デンマーク国, デーコー2900 ヘルラップ, ホースガルズ アレ 72